

Année 1963

N°
1026

THESE

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

BEASLAY Yvonne

Née le 19 Juin 1933 à VITRY-sur-SEINE

Ancienne Externe des Hôpitaux de Paris

Présentée et soutenue publiquement le

NOUVELLES ETUDES EXPERIMENTALES SUR LE ROLE
DES PLAQUETTES, DU FIBRINOGENE,
ET DE DIVERS FACTEURS DU PLASMA
DANS LE DETERMINISME DES
PROPRIETES THROMBODYNAMOGRAPHIQUES DU CAILLOT

Travail du laboratoire d'hématologie
(Pr. Agrégé M.E. LEROUX)
de la Maternité de l'Hôpital Bichat
(Docteur B. JAMAIN)

Président M. le Professeur G. MARCHAL



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153510_0005

Année 1963

N °

T H E S E

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

BEASLAY Yvonne

Née le 19 Juin 1933 à VITRY-sur-SEINE

Ancienne Externe des Hôpitaux de Paris

Présentée et soutenue publiquement le

NOUVELLES ETUDES EXPERIMENTALES SUR LE ROLE
DES PLAQUETTES, DU FIBRINOGENE,
ET DE DIVERS FACTEURS DU PLASMA
DANS LE DETERMINISME DES
PROPRIETES THROMBODYNAMOGRAPHIQUES DU CAILLOT

Travail du laboratoire d'hématologie
(Pr. Agrégé M.E. LEROUX)

de la Maternité de l'Hôpital Bichat
(Docteur B. JAMAIN)

Président M. le Professeur G. MARCHAL

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. ALAJOUANINE (T.) , AUBIN (A.) , BENARD (H.) , BULLIARD (H.) , CADENAT (F.) ,
 CHABROL (E.) , DEBRE (R.) , FEY (B.) , GALLIARD (H.) , GASTINEL (P.) ,
 HALPHEN (E.) , HAZARD (R.) , HEUYER (G.) , LANTUEJOUL (P.) , LAROCHE (G.) ,
 LAVIER (G.) , LEVY-SOLAL (E.) , LIAN (C.) , MATHIEU (P.) , MOCQUOT (F.) ,
 MONOD (R.) , MOREAU (R.) , MOULONGUET (P.) , MOUQUIN (M.) , OLIVIER (E.) ,
 PASTEUR VALLERY-RADOT , PETIT-DUTAILLIS (D.) , PIEDELIEVRE (R.) , QUENU (J.) ,
 RICHEL (C.) , SENEQUE (J.) , STROHL (A.) , TANON (L.) , VERNE (J.) .

DOYEN Léon BINET,
 Membre de l'Institut

1er ASSESSEUR Gaston CORDIER

2e ASSESSEUR Paul CASTAIGNE

I. - PROFESSEURS :

1°) CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

a) Professeurs titulaires :

	MM.
Anatomie	DELMAS (A.)
Anatomie pathologique	DELARUE (J.)
Anesthésiologie	BAUMANN (J.)
Biochimie médicale	(JAYLE (M.-F.)) SCHAPIRA (G.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports. . .	CHAILLEY-BERT (P.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
Cancérologie médicale et sociale	BERNARD (J.)
Embryologie.	TUCHMANN (H.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie (Lariboisière). .	JOANNON (P.)
Histologie	GIROUD (A.)
Hygiène et médecine préventive	BOYER (J.)
Médecine du Travail	DESOILLE (H.)
Médecine légale.	DEROBERT (L.)
Microbiologie (Bactériologie et virologie)	FASQUELLE (R.)
Parasitologie	BRUMPT (L.-C.)
Pathologie chirurgicale.	LAURENCE (G.)
Pathologie exotique	N...
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.-P.)
Pathologie médicale	N...
Pathologie respiratoire.	TURIAF (J.)
Pathologie et thérapeutique générales.	BOUDIN (G.)
Pharmacologie	CHEYMOL (J.)
Physiologie	(BINET (L.)) BARGETON (D.)
Physiologie et pathologie obstétricale	LEPAGE (F.)
Physique médicale	(DOGNON (A.)) DJOURNO (A.)

MM.

Radiologie médicale	DESGREZ (H.)
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale.	CAUCHOIX (J.)
Thérapeutique.	CONTE (M.)
Thérapeutique appliquée.	LAMOTTE (M.)

b) Professeurs à titre personnel :

Biochimie médicale	(DESGREZ (P.)
Biologie médicale	) POLONOVSKI (J.)
Hygiène et médecine préventive	BOURLIERE (F.)
Pharmacologie	DEPARIS (M.)
Physiologie	LEVY (Mlle J.)
Physique médicale.	PARROT (J.)
	KELLERSHOHN (L.)

2°) CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

a) Professeurs titulaires :

Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)	REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais)	SOULIE (P.)
(Beaujon	LORTAT-JACOB (J.-L.)
(Cochin	LEGER (L.)
(Cochin	ABOULKER (P.)
Cliniques chirurgicales (Hôtel-Dieu.	PATEL (J.)
(Pitié	CORDIER (G.)
(Saint-Antoine	GOSSET (J.)
(Salpêtrière	SICARD (A.)
(Tenon	OLIVIER (Cl.)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Mal.)	FEVRE (M.)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique (Cochin)	MERLE d'AUBIGNE (R.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais).	GAUDART d'ALLAINES (F.de)
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laennec).	MATHEY (J.)
Clinique endocrinologique (Pitié).	DECOURT (J.)
Clinique de Génétique médicale (Enfants-Malades)	LAMY (M.)
Clinique gynécologique (Broca)	HUGUIER (J.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis).	DEGOS (R.)
Clinique des maladies des Enfants (Enfants-Malades)	CATHALA (J.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard)	MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne)	DELAY (J.)
Clinique des maladies métaboliques (Necker).	HAMBURGER (J.)
Clinique des maladies du sang (Broussais)	MARCHAL (G.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)	CASTAIGNE (P.)
(Boucicaut	MILLIEZ (P.)
(Broussais	LENEGRE (J.)
(Cochin	JUSTIN-BESANCON (L.)
Cliniques médicales (Cochin	BROUET (G.)
(Hôtel-Dieu.	BARIETY (M.)
(Lariboisière.	SEZE (S. de)
(Pitié	DREYFUS (G.)
(Saint-Antoine	KOURILSKY (R.)
Clinique d'hydrologie et de climatologie (Bichat).	DEBRAY (C.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais).	GENNES (L. de)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel-Dieu).	DEROT (M.)

MM.

Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)	DAVID (M.)
Clinique neurologique (Salpêtrière)	GARCIN (R.)
Cliniques obstétricales	(Baudelocque) LACOMME (M.)
	(Foch (Suresnes)) MERGER (R.)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port Royal)	VARANGOT (J.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)	RENARD (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)	AUBRY (M.)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (Saint-Vincent-de-Paul)	LELONG (M.)
Clinique de pédiatrie sociale (Enfants-Malades)	MARIE (J.)
Clinique de pneumo-phthisiologie (Laennec)	BERNARD (E.)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpêtrière)	MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)	COSTE (F.)
Clinique stomatologique (Pitié)	DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)	ROUX (M.)
Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine)	LEMAIRE (A.)
Clinique toxicologique	GAULTIER (M.)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique	PADOVANI (P.)
Séméiologie médicale	DOMART (A.)
Séméiologie et clinique chirurgicales	POILLEUX (F.)
Clinique urologique (Necker)	COUVELAIRE (R.)
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)	TURPIN (R.)

b) Professeurs à titre personnel :

	(BOUR (H.)
Médecine	(LHERMITE (F.)
	(PEQUIGNOT (H.)

II. - PROFESSEURS SANS CHAIRE, PROFESSEURS AGREGES
ET MAITRES DE CONFERENCES - AGREGES

MM.

MM.

Anatomie	(CABROL (C.)	Biochimie médicale	(BAULIEU Et.m.conf.
	(COUINAUD (C.)		(BOURILLON (R.)
	(GILLOT (C.)		(CARTIER (P.)
	(OLIVIER (G.)		(DREYFUS (J.-Cl.)
	(pr.s.ch.		(GONNARD (P.)
Anatomie pathologi.	(GAUTHIER-VILLARS(Mlle P.)	Biologie appliquée à l'Education Physique et aux Sports	(KRUI (J.)
	(pr.s.ch.		(JEROME (H.)
	(ABELANET (R.)		PLAS (F.)
	(CHOMETTE (G.)		(BOIRON (M.)
	(GOUYGOU (Ch.), m.conf.		(DENOIX (P.)
Anesthésiologie	(NEZELOFF (Ch.)	Carcinologie	(MATHE (G.)
	(ORCEL (L.)		(SELIGMANN (M.)
	(PAILLAS (J.)		(CIVATTE (J.)
	(KERN (E.)		(DUPERRAT (B.)
	(VOURC'H (G.)		LEDoux-LEBARD(G.)
Bactériologie	(BARBIER (p.)	Electro-Radiologie	(BESSIS (M.)
	(pr.s.ch.		(BILSKI-PASQUIER (G.)
	(CHRISTOL (D.)		(DAUSSET (J.)
	(LE MINOR (L.)		(DUHAMEL (G.)
	(TOURNIER (P.)		

	MM.		MM.
	(COUJARD (R.),		(FLABEAU (F.)
	(pr.s.ch.		(GARBAY (M.)
Histologie	(MAROIS (M.)		(GARNIER (H.)
	(RACADOT (J.)		(Cl.de) GAUDART-d'ALLAINES
	(BESANCON (F.)		(GERMAIN (A.)
Hydrologie	(CORNET (A.)		(LATASTE (J.)
	(BOYER (J.)pr.s.ch.	Pathologie chirurgicale	(LOYGUE (J.)
	(BLANCHER (G.)		(MERCADIER (M.)
Hygiène	(CORRE-HURST (Mme L.)		(NATALI (J.)
	(SAPIN-JALCUSTRE (H.)		(PELLERIN (D.)
	(BASTIN (R.)		(PERROTIN (J.)
Maladies infectieuses	(pr. s. ch.		(ROBERT (H.)
	(DUPONT (V.)	Pathologie exotique . .	(THOMERET (G.)
	(FOURNIER (E.)		(SCHNEIDER (J.)
Médecine légale. . .	(GUENIOT (M.)		(BENHAMOU (J.-P.)
	(HALENGUE (A.)		(BERTHAUX (P.)
	(ALBAHARY (C.)		(BOIVIN (P.)
Médecine du travail..			(CROSNIER (J.)
Neuro-chirurgie . . .	PERTUISET (B.)	Pathologie expérimentale	(HARTMANN (L.)
Neurologie.	LAPRESLE (J.)		(LOEPPER (J.)Pr.s.ch.
	(GRANJON (A.)		(MAURICE (J.)
	(HERVET (E.)		(MIKOL (Cl.)
	(LE LORIER (G.)		(RICHET (G.)
	(LEVY (J.)		(AUSSANNAIRE (M.)
	(MORIN (P.)		(BOUVIER (J.)
Obstétrique	(MUSSET (R.)		(BOUVRAIN (Y.)
	(ROBEY (M.)		(BRICAIRE (H.)
	(SENEZE (J.)		(BRISSAUD (H.)
	(SUREAU (C.)		(BROCARD (H.)
	(THOYER-ROZAT(J.)		(BUGE (A.)
	(BREGEAT (P.)		(CATINAT (J.)
Ophthalmologie . . .	(DUBOIS (A.)		(CHRETIEN (J.)
	(SARAUX (H.)		(COBLENTZ (B.)
	(JUDET (R.)	Pathologie médicale . .	(CONTAMIN (F.)
	(MEARY (R.)		(COURY (C.)
Orthopédie	(POSTEL (M.)		(ETIENNE (J.-P.)
	(RAMADIER (J.)		(FREZAL (J.)
	(DEBAIN (J.)		(FRITEL (D.)
Oto-Rhino-Laryngolog.	(PIALOUX (P.)		(HENNEQUET (A.)
	(GOLVAN (Y.)		(HIMBERT (J.)
Parasitologie	(LAPIERRE (J.)		(HOUSSET (E.)
	(BARCAT (J.)		(LAROCHÉ (Cl.)
	(BINET (J.-P.)		(LESOBRE (R.)
	(CERBONNET (G.)		(LEVEQUE (B.)
Pathologie chirurgic.	(CHATELIN (C.-L.)		(MACREZ (C.)
	(DUBOST (Ch.)		(MOREAU (L.)
	(DUBOST (Cl.)		(NICK (J.)
	(FAUREL (J.)		(ROYER (P.)
			(TOURNEUR (R.)
			(WOLFROMM (R.)

	MM.		MM.
	(LAFOURCADE (J.)		(KREIS (B.)
	(LEPERCQ (G.)	Pneumo phtisiologie . .	(MEYER (A.)
	(MANDE (R.)		(RENAULT (P.)
Pédiatrie-Puériculture	(MOZZICONACCI (P.)	Psychiatrie	PICHOT (P.)
	(POLONOVSKI (C.)		(DENIKER (P.)
	(ROSSIER (A.)	Psychiatrie infantile	(DUCHE (D.)
	(VIALATTE (J.)		(FLAVIGNY (H.)
Pharmacologie	(BOISSIER (J.)		
	(LECHAT (P.)	Rhumatologie	DELBARRE (F.)
	(BARRES (G.)		pr.s.ch.
	(DEJOURS (P.)		(CERNEA (P.)
	(pr.s.ch.		(CHAPUT (Mme A.)
Physiologie	(DURAND (J.)	Stomatologie	(m.c.agr.
	(GIRARD m.conf.		(GRELLET (M.)
	(HUGELIN (A.)		
	(SCHERRER (J.)	Thérapeutique	(CHASSAGNE (P.)
	(CHANTEUR (J.)		(MARCHE (J.)
	(GOUGEROT (L.),		
	(m.conf. pr.s.ch.		(AUVERT (J.)
Physique médicale . . .	(GREMY (F.) m.conf.	Urologie	(MOULONGUET (A.)
	(MILHAUD (G.)		(QUENU (L.)
	(PELLERIN (P.)		
	(ROUCAYROL (J.Cl.)		
	(TURBIANA (M.)		
	(m.conf.		

III.- PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGES
CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE
à titre permanent

	MM.		MM.
Anatomie	DEBEYRE (J.)	Clinique ophtalmologique	(DESVIGNES (P.)
			(OFFRET (G.)
Clinique chirurgicale	VERNE (J.-M.)		
	(PERRAULT (M.)	Clinique pédiatrique	
	(RAMBERT (P.)	et puériculture . . .	LAPLANE (R.)
Clinique médicale . . .	(THIEFFRY (S.)		
		Clinique psychiatrique	BARUK (H.)
Clinique obstétricale	(GRASSET (J.)		
	(MAYER (M.)	Clinique urologique . .	KUSS (R.)

IV. - PROFESSEURS DETACHES
DANS LES UNIVERSITES ETRANGERES

Bactériologie	HAUDUROY (P.) Pr.s.ch.
Pathologie chirurgicale	RUDLER (J.) Pr. s.ch.

MM.

V.- CHARGES DE COURS D'HYGIENE SCOLAIRE ET UNIVERSITAIRE (BOLTANSKI (E.)
(LAUNAY (C.)

Secrétaire général de la Faculté M. LENA (J.)

Secrétaire principal Mlle CHAINTREUIL (G.)

Conservateur en Chef de la Bibliothèque (

Conservateur du Musée d'Histoire de la)

Médecine (M. le Docteur HAHN (A.)

Conservateurs Mlles DUMAITRE (P.) , LE NOIR (G.) ,
QUIEVREUX (E.)

Bibliothécaire. (Mmes CONTET (J.) , FORGET (F.),
(Mlle LAURENT (H.)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A mon Père et à ma Mère,

A mes beaux-parents,

A ma Famille,

A mes Amis.

A mon mari,

inséparable compagnon de mes longues
années d'étude, dont la tendresse,
jamais en défaut, m'a apporté l'équilibre.

A mon Président de thèse

Monsieur le Professeur MARCHAL,
Professeur en la chaire de clinique des maladies du sang de
la Faculté de Médecine de Paris,
Membre de l'Académie Nationale de Médecine,
Chevalier de la Légion d'Honneur.

qui en m'accueillant dans son service m'a permis de
compléter ma formation clinique et m'a enseigné
les premiers éléments de l'hématologie,

qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de
cette thèse qui concerne un domaine de l'hémato-
logie à la connaissance duquel il a beaucoup
contribué.

En témoignage de mon profond respect.

A mon maître

Monsieur le Professeur agrégé M E. LEROUX,
Maître de conférences agrégé à la Faculté de Médecine de Tours,
Chef de laboratoire à la clinique des maladies du sang de la
Faculté de Médecine de Paris et à la Maternité de l'Hôpital
Bichat,

qui m'a enseigné les techniques de laboratoire en
hématologie et orienté vers la recherche,

qui m'a proposé le sujet de cette thèse et m'a guidé
de ses conseils éclairés tout au long de sa réa-
lisation.

Avec toute ma gratitude pour son enseignement
théorique et pratique au cours de ces quatre
années où j'ai travaillé dans son laboratoire.

A mon maître

Monsieur le Docteur B. JAMAIN,

Gynécologue accoucheur de l'Hôpital Bichat,

Professeur au Collège de Médecine des Hôpitaux de Paris,

Chevalier de la Légion d'honneur,

qui m'a enseigné les bases de la gynécologie et de
l'obstétrique et en m'ouvrant les portes de son
laboratoire a permis à ma vocation de médecin-
biologiste de s'épanouir,

et qui s'intéressant avec enthousiasme à la thrombo-
dynamcgraphie, m'a toujours encouragé au cours
de mes recherches.

En témoignage de mon respect et de
ma profonde gratitude.

A mon maître,

Monsieur le Docteur VALENTIN,
Biologiste des Hôpitaux de la Seine,

qui m'a accueilli avec bienveillance dans son
laboratoire et m'a permis d'acquérir des connais-
sances pratiques dans toutes les branches de la
biologie médicale.

En témoignage respectueux.

A Monsieur le Docteur SOLLE

Assistant de Biologie des Hôpitaux de Paris,

dont l'enseignement et les conseils m'ont
toujours été très précieux.

Avec toute ma gratitude.

A mes maîtres,

dans les hôpitaux,

Monsieur le Professeur Henri BENARD,

Monsieur le Professeur agrégé BROCARD,

Monsieur le Docteur TANRET,

Monsieur le Docteur LIEVRE,

Monsieur le Docteur BLATRIX.

A mes maîtres en hématologie,

Monsieur le Professeur agrégé BILSKI-PASQUIER,

Monsieur le Professeur agrégé DUHAMEL,

Madame le Docteur PERLES, chef de travaux à
la Faculté de Médecine de Paris.

Que tous ceux qui m'ont apporté leur aide ou se sont intéressés à ces recherches veuillent bien trouver ici l'expression de mes remerciements :

Monsieur le Professeur Agrégé J.-P. SOULIER,
Maître de Conférences Agrégé d'Hématologie
à l'Ecole Nationale de Médecine de Rouen,
Directeur du Centre National de Transfusion
Sanguine ;

le Médecin-Colonel MAUPIN,
Directeur du Centre de Transfusion-Réanimation
de l'Armée "Jean-Julliard" ;

Monsieur le Professeur BISERTE,
Titulaire de la chaire de Chimie pathologique
de la Faculté de Médecine de Lille ;

Madame M. STEINBUCH,
Chef du Service des fractionnements au
Centre National de Transfusion Sanguine ;

Monsieur le Docteur FACQUET,
Médecin des Hôpitaux,
Chef du Centre de Cardiologie de l'Hôpital
Tenon ;

et ses assistants,
les Docteurs ALHOMME, COLVEZ et NIVET ;

Madame BAPICOT,
Surveillante au Laboratoire de la Maternité,
dont l'enthousiasme, l'esprit d'initiative
et le dévouement m'ont été très précieux
au cours de la réalisation de ce travail ;

Mesdames PECH, GAIBISSO, FREMONT,
personnel dévoué du Laboratoire ;

et tout le personnel de la Maternité.

I N T R O D U C T I O N

La signification des constantes transversales en thrombodynamographie est connue dans ses grandes lignes, cependant beaucoup de points restent encore obscurs et méritent d'être étudiés de façon plus approfondie.

Notre propos sera donc dans cette thèse de tenter de faire une mise au point de la question et d'en préciser certaines inconnues sans avoir toutefois la prétention d'épuiser le débat.

- Dans une première partie nous étudierons le rôle des plaquettes, de leur nombre, de leur qualité et nous verrons quelles manipulations il est possible de leur faire subir sans altération : lavages, incubation, centrifugation, et les effets obtenus par leur incubation dans différentes substances. Nous étudierons aussi le rôle du facteur Hageman (facteur XII) sur les plaquettes et le rôle des plaquettes dans la fibrinolyse.

- Nous envisagerons ensuite le rôle du fibrinogène et la valeur des différentes fractions qui en contiennent : fraction I de Cohn standard, fibrinogène de boeuf, fibrinogène humain type Blombäck.

- Enfin, nous étudierons l'action du sérum et de différents facteurs protéiques sur le plasma riche en plaquettes et sur le plasma déplaqueté.

Nos recherches ayant été faites dans le laboratoire du Professeur Agrégé M. E. Leroux à la maternité de l'Hôpital Tenon puis de l'Hôpital Bichat (service du Docteur B. Jamain) leurs principaux résultats ont déjà été publiés en partie (51 - 52 - 65) mais n'ont jamais été rapportés dans le détail. Cependant nous pensons qu'ils méritent de l'être car si les grandes lignes en sont bien connues ils apportent néanmoins des précisions intéressantes.

CHAPITRE PREMIER

* * *

C'est Hartert (34 - 35) qui, le premier, a défini les constantes des diagrammes thrombodynamographiques et étudié leur signification physiologique.

Rôle des plaquettes -

Hartert a mis en évidence le rôle du nombre et d'une certaine qualité des plaquettes dans la propriété qu'il appelait "élasticité du caillot".

Tous les autres auteurs et en particulier de Nicola (22) ont retrouvé ces faits. L'adjonction de plaquettes en quantité croissante dans un plasma déplaquetté montre l'augmentation de $E_m = \frac{100 A}{100 - A}$ en fonction du nombre des plaquettes selon une courbe hyperbolique (fig. I).



Fig. I : Courbe de l'accroissement de E_m en fonction du nombre des plaquettes, selon Hartert.

Hartert (35 - 36) et Braunsteiner (10) avaient noté, du point de vue clinique, que les diagrammes dans les thrombasthénies du type Glanzmann présentent une diminution de A_m .

En 1957 M.E. Leroux (49) dans sa thèse a mis en évidence la double fonction des plaquettes :

- Fonction thromboplastique dans la phase enzymatique de la coagulation.
- Fonction thrombodynamique qui est en cause dans les variations des valeurs de A_m et qui est une fonction vitale des éléments figurés plaquettaires.

D'autre part il a montré que le rapprochement des deux branches du diagramme du plasma riche en plaquettes (PRP) en l'absence d'image identique sur le plasma déplaqueté (PDP) est dû au phénomène de rétraction du caillot caractéristique de la présence de plaquettes thrombodynamiques et fonction directe de leur nombre et de leur activité.

Il a enfin découvert l'importance de l'enregistrement simultané des diagrammes de PRP et PDP, la constante A_m (PRP) - A_m (PDP) = A_p , introduite ultérieurement en 1961 par lui avec Samama et Marchal (51 - 52 - 53 - 65) rendant compte de façon beaucoup plus exacte du rôle des plaquettes.

Prost (81) dans sa thèse a repris l'étude du rôle des plaquettes dans l'amplitude maxima des diagrammes. Elle obtient une courbe de variation de A_m en fonction du nombre des plaquettes qui présente une allure hyperbolique. Elle insiste sur l'importance de la constante A_p mais c'est M.E. Leroux (53) qui a introduit dans la pratique l'enregistrement simultané des deux diagrammes de PRP et PDP.

Marchal, Samama, M.E. Leroux, et Prost (66) ont mis au point deux tests d'exploration de la fonction thrombodynamique des plaquettes applicables en clinique :

- un test standard qui exprime l'activité thrombodynamique globale des plaquettes ;
- un test qualitatif qui exprime l'activité thrombodynamique unitaire des plaquettes.

Rôle du fibrinogène -

Nous voyons donc que l'attention a été attirée dès le début sur le rôle des plaquettes dans l'amplitude des diagrammes et que de nombreux travaux leur ont été consacrés négligeant l'existence possible d'autres facteurs. Mais on s'est aperçu petit à petit que d'autres éléments devaient entrer en jeu.

Hartert lui-même (34 - 35) avait déjà parlé de l'importance du fibrinogène : "En s'accroît", écrivait-il, "en fonction de la quantité de fibrinogène selon une courbe sigmoïde (fig. II).

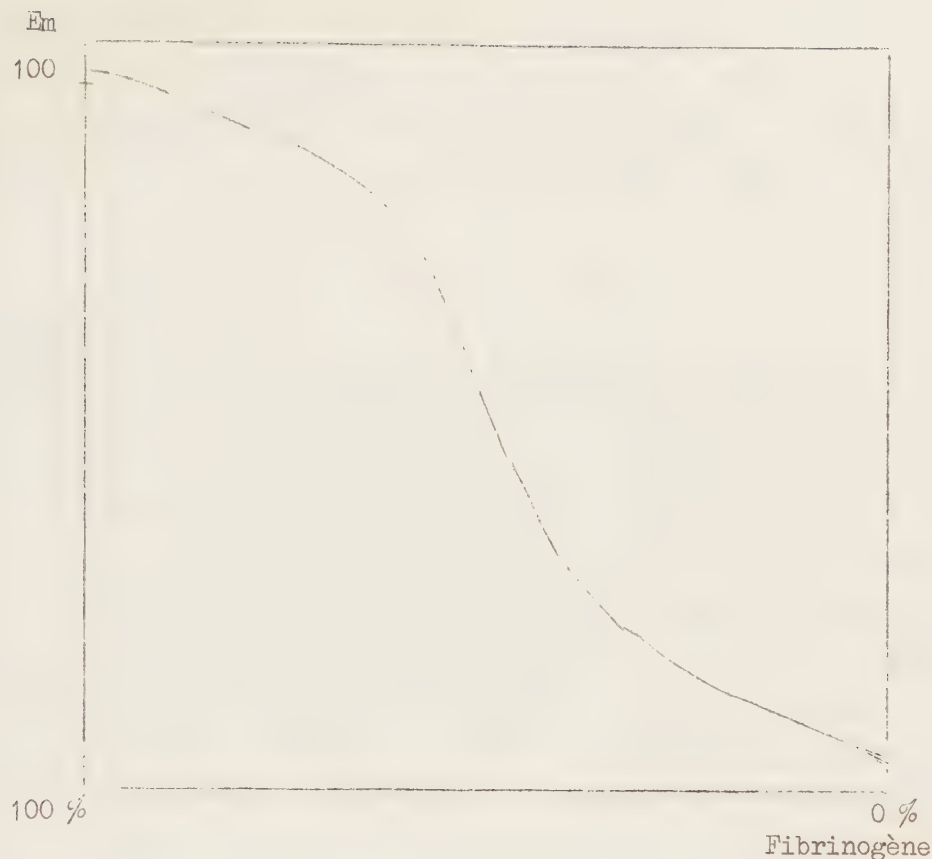


Fig. II : Courbe de l'accroissement de E_m en fonction de la quantité de fibrinogène, selon Hartert.

M.E. Leroux (49) avait fixé à 2 g pour 1000 la quantité minima de fibrinogène nécessaire pour avoir une amplitude normale avec le plasma riche en plaquettes (PRP).

Hartert considérait que l'influence du déficit en fibrinogène n'était sensible que pour des valeurs inférieures à 2 g pour 1000 et qu'au-delà de cette quantité E_m était une variable spécifique des plaquettes.

Dopuis, de nombreux auteurs ont démontré le rôle très important du fibrinogène dans l'amplitude maxima des diagrammes.

P. de Nicola (22), Sokal (94) Vreeken (108) entre autres ont noté l'influence expérimentale du fibrinogène sur E_m . Ils pensent que la relation entre E_m et le taux de fibrinogène s'établit selon une courbe linéaire.

Prost (81) étudiant la variation de A_m (PRP) en fonction du taux de fibrinogène obtient une courbe d'allure parabolique. Quant à la courbe de variation de A_m (PDP) elle présente une allure sigmoïde très étalée.

Sokal (94) a montré que l'on peut obtenir des tracés très larges en faisant coaguler des solutions de fibrinogène par la thrombine en l'absence de plaquettes. L'amplitude maxima varie alors en fonction de la concentration en fibrinogène et aussi en thrombine. Ceci fut aussi constaté par Marx (69), Weiner et Weinberg (110).

Rôle du sérum -

En 1954 Hartert (37) montra que dans un système purifié constitué par du fibrinogène, des plaquettes et de la thrombine on n'observe pas de rétraction et pas d'amplitude élevée au thrombodynamogramme à moins d'ajouter du sérum. Quelques auteurs, Budtz-Olsen (11) Fricott et Corley (26) avaient déjà mis en évidence cette influence du sérum sur les propriétés du caillot par d'autres procédés que le TDG. Hartert postule la nécessité d'un cofacteur protéique dont il ne précise pas la nature mais qui serait pour lui différent de la globuline plasmatique étudiée par Laki et Lorand (47), globuline qui rend la fibrine insoluble dans l'urée. L'activité du sérum sur l'amplitude maxima a été confirmée par d'autres auteurs, en particulier de Nicola (22), Marx (69) et Vreeken (103).

M.E. Leroux a insisté dans sa thèse sur l'importance de ce facteur sérique et, en bloquant les groupements thiol du sérum et de diverses fractions contenant du fibrinogène, il l'a identifié au facteur de stabilisation de la fibrine de Lorand et Laki. C'est lui aussi qui a étudié les premiers cas de déficit acquis de ce facteur.

Prost, après quelques expériences, confirme l'influence certaine du sérum sur l'amplitude maxima, l'action de ce facteur sérique ne se manifestant qu'en présence de calcium.

Sokal (95) reprenant les expériences sur ce facteur protéique constate l'action manifeste du sérum sur un système purifié, action qui persiste après trente minutes de chauffage à 56°, ou après adsorption sur sulfate de baryum. Cette activité sérique lui semble liée à la fraction albumine ; ceci avait déjà été signalé par Schulman (92).

Enfin, en 1960, Duckert, Jung, et Schmerling (25) publient les premiers cas de déficit congénital en facteur de stabilisation de la fibrine et les anomalies graphiques correspondantes.

CHAPITRE II

* * *

TECHNIQUES D' ETUDE

1 - THROMBODYNAMOGRAPHIE -

(Thrombodynamogramme de Hellige types C et D)

Le prélèvement de sang est effectué à l'aide d'aiguilles à plateau hydrofugées à l'Arquad 2C Armour. La ponction veineuse doit être franche et réussie dès la première tentative. Après rejet des deux premiers millilitres, on recueille 8 ml de sang sur 2 ml de citrate trisodique à 3,8 p. 100, dans un flacon siliconé par le Rhodorsil 240 RP en solution à 10 p. 100 dans l'éther de pétrole.

En ce qui concerne les conditions de la conservation du plasma, nous nous sommes conformés aux résultats de M. E. Leroux (49) et Gagliardi (29) et n'avons pas réétudié le problème.

Le sang est donc conservé à 4° et utilisé dans les deux heures suivant le prélèvement.

Si l'on met à part le cas particulier de troubles importants de la sédimentation dont nous ne nous sommes pas occupés, car ils sortent du cadre de notre étude, on obtient toujours ainsi une quantité suffisante de plasma de sédimentation.

On introduit dans une cuve de l'appareil 0,25 ml de plasma prélevé avec une pipette siliconée à mi-distance entre les interfaces air-plasma et plasma-globules.

Avec une seringue et une aiguille spécialement recourbée on ajoute 0,10 ml d'une solution de chlorure de calcium cristallisé à 1,29 p. 100 (préparée en diluant au quart extemporanément une solution-mère à 5,16 p. 100 en évitant de faire des bulles d'air. On abaisse alors le système de torsion et on recouvre le milieu coagulable d'une couche d'huile de paraffine pour le préserver de la dessiccation.

On abaisse ensuite le levier de commande du spot exactement une minute après l'introduction du calcium, ce dont on tiendra compte pour la lecture des constantes longitudinales.

Les tracés sont enregistrés pendant deux heures en moyenne, beaucoup plus longtemps dans certains cas.

Pour chaque prélèvement de sang nous effectuons systématiquement deux examens, selon la méthode proposée pour la première fois par M. E. Leroux en 1957 (49).

- L'un sur le plasma obtenu par sédimentation spontanée pendant deux heures : le plasma a conservé toutes ses plaquettes, il représente le plasma riche en plaquettes ou PRP.

- L'autre sur le plasma centrifugé trente minutes à 4.500 t/min, en tubes siliconés, dans une centrifugeuse réfrigérée à 4° C (centrifugeuse Martin Christ, modèle Universal Junior 1 - KS). Comme nous le montrerons plus loin, ce plasma est alors pratiquement privé de ses plaquettes : c'est le plasma déplaqueté ou PDP.

L'intérêt de l'étude systématique du PDP et la difficulté d'interprétation de l'amplitude maxima du PRP en l'absence de diagramme de PDP ont été confirmés par toute une série de travaux récents (51 - 52 - 53 - 65).

Constantes

Sur les diagrammes obtenus nous étudierons quatre constantes telles qu'elles ont été définies par Hartert (34 - 35 - 36) et M. E. Leroux (49).

- Trois constantes longitudinales : r , k , $r + k$, qui s'expriment et se mesurent en millimètres mais représentent des temps, sachant que 2 mm = 1 minute.

- Une constante transversale : A_m .

Les valeurs normales de ces constantes varient un peu selon les auteurs et nous avons réuni les données les plus classiques dans le tableau 1.

Tableau n° 1

VALEURS MOYENNES ET VARIATIONS EXTREMES
DES CONSTANTES r, k, Am, selon les auteurs

	r	k	Am
Hartert (1949)	17	6,5	55
M.E.Leroux (1957)	15 à 21,5 18	4,5 à 8,5 6,5	46 à 62,5 54
R.J. Prost (1959)	12 à 20 17	4,5 à 7,5 6	55 à 65 60
Schneider (1962)	14 à 19 17	6,5 à 9,5 8	49 à 56 52
Marchal, M.E.Leroux, Samama (1962)	15 à 21,5 18	4,5 à 8,5 6,5	50 à 62,5 54

L'étude statistique de Schneider (90) qui est la plus récente porte sur 127 sujets normaux des deux sexes. Il utilise cependant des conditions de décalcification légèrement différentes des nôtres.

Nous avons refait une étude statistique qui porte sur 500 sujets normaux des deux sexes car il nous semblait y avoir quelques points de désaccord, en particulier sur la valeur de Am.

Voici nos résultats :

r	: Moyenne 17,5 mm	Valeurs extrêmes	: 12 à 22 mm
k	: Moyenne 8 mm	Valeurs extrêmes	: 4 à 9,5 mm
Am PRP	: Moyenne 55,5 mm	Valeurs extrêmes	: 46 à 65 mm
Am PDP	: Moyenne 22 mm	Valeurs extrêmes	: 8 à 33 mm

Nous avons étudié aussi la constante $A_p = A_{m1} - A_{m2}$ où $A_{m1} = A_m$ (PRP)

$A_{m2} = A_m$ (PDP)

et $\frac{A_{m1}}{A_{m2}}$ pour voir si cette dernière valeur paraissait plus intéressante.

La constante A_{m1} dépend des plaquettes, du fibrinogène et des facteurs accessoires, tandis que A_{m2} dépend essentiellement du fibrinogène et des facteurs accessoires puisque les plaquettes sont absentes.

A_p est donc plus spécifique que A_{m1} de la fonction thrombodynamique des plaquettes.

Enfin dans certains cas nous avons étudié la rétraction du caillot et mesuré les constantes de rétraction telles qu'elles ont été définies par M. E. Leroux (49).

2 - NUMERATION DES PLAQUETTES -

Le sang veineux est recueilli sur héparine sèche puis on en fait une dilution au 1/100 dans une pipette mélangeuse de Potain par la solution suivante : Novocaïne 3 g, ClNa 0,2 g, H₂O 100 ml, selon la modification qu'a apportée Feissly (28) à sa technique originale utilisant la cocaïne. Cette technique a été introduite en France par M. E. Leroux. Cette solution provoque la lyse des hématies et le gonflement des plaquettes, elle permet donc de les compter facilement et avec précision à la cellule de Thoma, au microscope à contraste de phase, après avoir attendu une vingtaine de minutes, temps nécessaire à l'hémolyse et à la sédimentation des plaquettes.

3 - DOSAGE DU FIBRINOGENE -

Nous avons utilisé la technique de Leroux, Prugnaud, et Frigot (50).

Le sang est prélevé sur citrate trisodique à 9 p. 100 (0,5 ml de citrate pour 9 ml de sang), puis centrifugé 15 minutes à 4.500 t/mn dans un tube gradué en ml et demi-ml, ce qui permet de mesurer le volume plasmatique.

Dans un verre à pied on prend n ml de plasma (entre 3 et 5 ml).

Dans une éprouvette graduée on introduit $\frac{n}{5}$ ml de solution de thrombase Roussel (Une ampoule de poudre à dissoudre dans 5 ml d'eau physiologique), on complète à un volume de 9 n ml avec de l'eau physiologique tamponnée à pH 7,3 (tampon de Michaelis)*.

*Tampon de Michaelis -	Solution A : Véronal sodique	=	7,36 g	
	Acétate de sodium	=	4,86 g	
	Eau distillée	=	250 ml	
	-Solution tampon :	Solution A		= 250 ml
		Solution ClH 0,1 N		= 217 ml
		Eau physiologique 9 p.100		= 200 ml
		Eau distillée		= 683 ml

On verse alors le contenu de l'éprouvette dans le verre à pied et on laisse la coagulation se produire pendant 10 minutes.

Le coagulum est alors recueilli sur un carré de nylon avec lequel on fait un nouet pour l'essorer. Après lavage, séchage à l'alcool et à l'éther puis 15 minutes à l'étuve à 100° C, on pèse à la balance au 1/10 de milligramme.

Le résultat est exprimé en grammes pour 1.000 par un calcul tenant compte de la quantité de citrate contenu dans la prise d'essai et selon la formule :

$$P = \frac{p}{n - \frac{0,50}{V} n}$$

dans laquelle P = poids de fibrinogène par litre

p = poids de fibrinogène pesé en mg

V = volume plasmatique

n = volume de la prise d'essai

D'après notre statistique portant sur 500 sujets normaux les résultats sont compris entre 1,9 et 4,5 g p. 1000, avec une moyenne de 3,25 g pour 1000.

4 - MESURE DE LA VITESSE DE LYSE SPONTANÉE DU CAILOT DES EUGLOBULINES -

Plusieurs auteurs ont étudié cette méthode dont le principe a été publié par Milstone (73) dès 1941. Elle a été introduite dans la pratique plus tard par von Kaulla et Schultz (108) et a fait l'objet de différentes adaptations techniques notamment celle de Kowalski et Niewiarowski (46).

Elle repose sur la précipitation des euglobulines par dilution dans l'eau distillée et acidification. Ce précipité ne contient plus que le plasminogène et ses activateurs, tandis que les inhibiteurs se retrouvent dans le surnageant.

Technique de von Kaulla -

Le sang citraté (8 ml de sang sur 2 ml de citrate à 3,8 p. 100) est centrifugé pendant 4 minutes à 1000 t/mn. Le plasma est dilué au 1/16 en eau distillée et on obtient la précipitation des euglobulines par une acidification à pH 5,2 réalisée en envoyant à la surface du liquide un courant de CO₂, tandis qu'on agite régulièrement l'Erlenmeyer sans provoquer de mousse. L'action du CO₂ est poursuivie pendant 4 minutes.

Le précipité d'euglobulines séparé par une centrifugation de 5 minutes à grande vitesse est repris par 1 ml d'une solution comportant une partie de tampon de Michaelis pour trois parties d'eau salée à 9 p. 1000. Les euglobulines se redissolvent en 1 minute sous forme de solution opalescente.

Les opérations suivantes doivent être effectuées rapidement en moins d'un quart d'heure pour éviter la coagulation spontanée de la solution d'euglobulines.

On répartit dans deux tubes à hémolyse 0,3 ml de cette solution, que l'on coagule par addition de 0,1 ml d'une solution de thrombine à 10 U par ml (thrombase Roussel). La coagulation se produit en quelques secondes, même quand les euglobulines proviennent d'un sang hépariné.

Les tubes sont bouchés et placés au bain-marie à 37°C.

On déclenche un chronomètre et on surveille la lyse du caillot. Elle est complète lorsque le caillot est liquéfié et qu'aucun filament de fibrine ne persiste.

Le test doit être effectué immédiatement après la prise de sang car il se produit une perte d'activité dans le sang conservé. Cette perte d'activité est diminuée mais pas totalement supprimée par la congélation du plasma.

Dans notre expérience nous avons des temps de lyse compris entre trois et six heures chez les sujets normaux.

Dans les états préfibrinolytiques les temps de lyse sont compris entre trente et quatre vingt dix minutes.

Lorsque le temps de lyse est inférieur à 30 minutes il s'agit d'une fibrinolyse vraie.

Dans la lecture des résultats il faut tenir compte théoriquement de la richesse du plasma en fibrinogène. Pratiquement, en clinique et dans notre expérience, la concentration du fibrinogène dans le plasma ne modifie pas les résultats.

En dehors de cette technique que nous avons le plus souvent utilisée, nous avons essayé aussi la technique de Kowalski et Niewiarowski qui est très voisine de la technique originale de Milstone.

Les euglobulines sont précipitées à partir du plasma oxalaté dilué au 1/17 en eau distillée et porté à pH 5,3 en ajoutant 0,15 ml d'une solution d'acide acétique à 1 p. 100.

Après un séjour de trente minutes à 4° C, on centrifuge le précipité cinq minutes à grande vitesse. Le culot est dissous dans 1 ml de tampon boraté de Palitsch * et coagulé par 0,1 ml de thrombine calcique.

spontanée

Dans certains cas on observe une coagulation/des euglobulines. Pour éviter ce phénomène on peut redissoudre le culot des euglobulines en ajoutant du citrate de sodium à 4 p. 100 au tampon boraté.

Cette technique est, elle aussi, satisfaisante mais ne donne pas de résultats supérieurs à la précédente.

Signalons que dans la technique de von Kaulla, Buckell (12) bannit l'emploi du citrate préférant celui de l'oxalate.

5 - TESTS D'EXPLORATION DE LA FONCTION THROMBODYNAMIQUE -

Ils ont été mis au point par Marchal, Samama, M. E. Leroux et Prost (66).

Test Standard :

Il consiste à mesurer la constante $A_p = A_{m1} - A_{m2}$. Le chiffre trouvé exprime l'activité thrombodynamique globale des plaquettes étudiées. Les chiffres normaux sont compris entre 31 et 50 mm (66).

Test Qualitatif :

Il consiste à enrichir un PDP normal citraté substrat dont on connaît la constante A_{m2} (choisie aussi voisine que possible de 20 mm) à l'aide d'un nombre constant de plaquettes à étudier ; ces dernières sont séparées du PRP d'origine par une centrifugation à 5000 t/mn pendant 30 minutes à 4°C, en matériel siliciné. Ce PRP provient de la sédimentation spontanée pendant deux heures d'un sang recueilli sur EDTA en matériel hydrofugé. Les plaquettes sont mises en suspension dans le PDP substrat aux concentrations successives de 25.000, 50.000, 100.000 / mm³.

Les trois chiffres trouvés pour A_p sont comparés aux chiffres normaux établis sur des témoins (Tableau n° 2).

Ce test exprime l'activité thrombodynamique unitaire des plaquettes étudiées.

* Tampon de Palitsch (pH 7,6)

- Solution A : Borate de soude 0,05 M 19,108 g/litre d'eau
distillée
- Solution B : Acide borique 12,404 g
ClNa 2,925 g/litre d'eau
distillée
- Solution Tampon : 1,2 partie de solution A
8,8 parties de solution B

Tableau n° 2

Valeurs normales de la constante A_p correspondant à 25.000, 50.000, 100.000 plaquettes par mm^3 permettant d'interpréter les résultats du test qualitatif d'exploration de la fonction thrombodynamique.

Constantes dynamiques A_p des plaquettes explorées à trois concentrations nu- mériques différentes	Valeurs normales (mm)	
	moyenne	extrêmes
25.000 plaquettes/ mm^3	22	16 à 29
50.000 plaquettes/ mm^3	30	22 à 37
100.000 plaquettes/ mm^3	38	31 à 44

C H A P I T R E I I I

* * *

RECHERCHES SUR LES CONDITIONS DE PREPARATION D'UN PLASMA DEPLAQUETTE

=====

Des travaux antérieurs avaient montré qu'il est impossible de se débarrasser complètement des plaquettes par la centrifugation. En effet certaines restent toujours en suspension, tandis que d'autres s'altèrent en libérant des facteurs plaquettaires. Cependant la centrifugation à 4.500 t/mn, pendant 20 minutes, d'un plasma riche en plaquettes permet de le débarrasser pratiquement de ses plaquettes et de préparer ce qu'il est d'usage d'appeler un plasma dépourvu de plaquettes (PDP).

TECHNIQUE -

On centrifuge des PRP normaux à 4°C en matériel siliconé respectivement aux vitesses de 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 4.000 et 4.500 t/mn c'est-à-dire qu'on applique un champ centrifuge variant de 300 à 2750 g.

Pour chaque champ centrifuge on étudie l'état de la sédimentation des plaquettes en arrêtant la centrifugation toutes les quatre minutes et en prélevant un échantillon à la partie supérieure du plasma.

On centrifuge ainsi par périodes de 4 minutes jusqu'à obtention, à tous les examens, d'un diagramme constant qui peut alors être considéré comme correspondant au PDP.

Pour chaque série d'expériences un diagramme initial de référence est toujours enregistré sur le PRP.

Nous avons ainsi étudié les variations des constantes r , k , $r + k$, et Am_1 , et établi les courbes individuelles puis une courbe moyenne de ces variations (fig. III, IV, V, VI).

RESULTATS -

Constante r (tableau 3)

Quelle que soit la vitesse de centrifugation elle s'allonge progressivement en fonction du temps, mais toujours en deux paliers. Sa valeur passe par un premier maximum entre la huitième et la seizième minute. Entre la seizième et la vingtième minute la valeur de r diminue de façon constante, puis au-delà r s'allonge de nouveau.

Constante k (tableau 4)

A 1.500 t/mn, k reste stable pendant les huit premières minutes, s'allonge nettement entre la huitième et la douzième minute puis, très progressivement ensuite, pour atteindre finalement à peu près le double de sa valeur initiale à la vingt quatrième minute et reste stable ensuite.

A 2.000 t/mn, k augmente très progressivement surtout à partir de la seizième minute.

A 2.500 t/mn, k augmente peu jusqu'à la huitième minute puis très progressivement jusqu'à la vingt quatrième minute. Entre la vingt quatrième et la vingt-huitième minute, l'allongement de k est très net puis la valeur de k se stabilise.

A 3.000 t/mn, k augmente progressivement dès la quatrième minute, puis de façon plus nette entre la douzième et la vingt quatrième minute puis se stabilise.

A 4.000 et 4.500 t/mn, k augmente très rapidement dans les douze premières minutes puis se stabilise à peu près.

Constante $r + k$ (tableau 5)

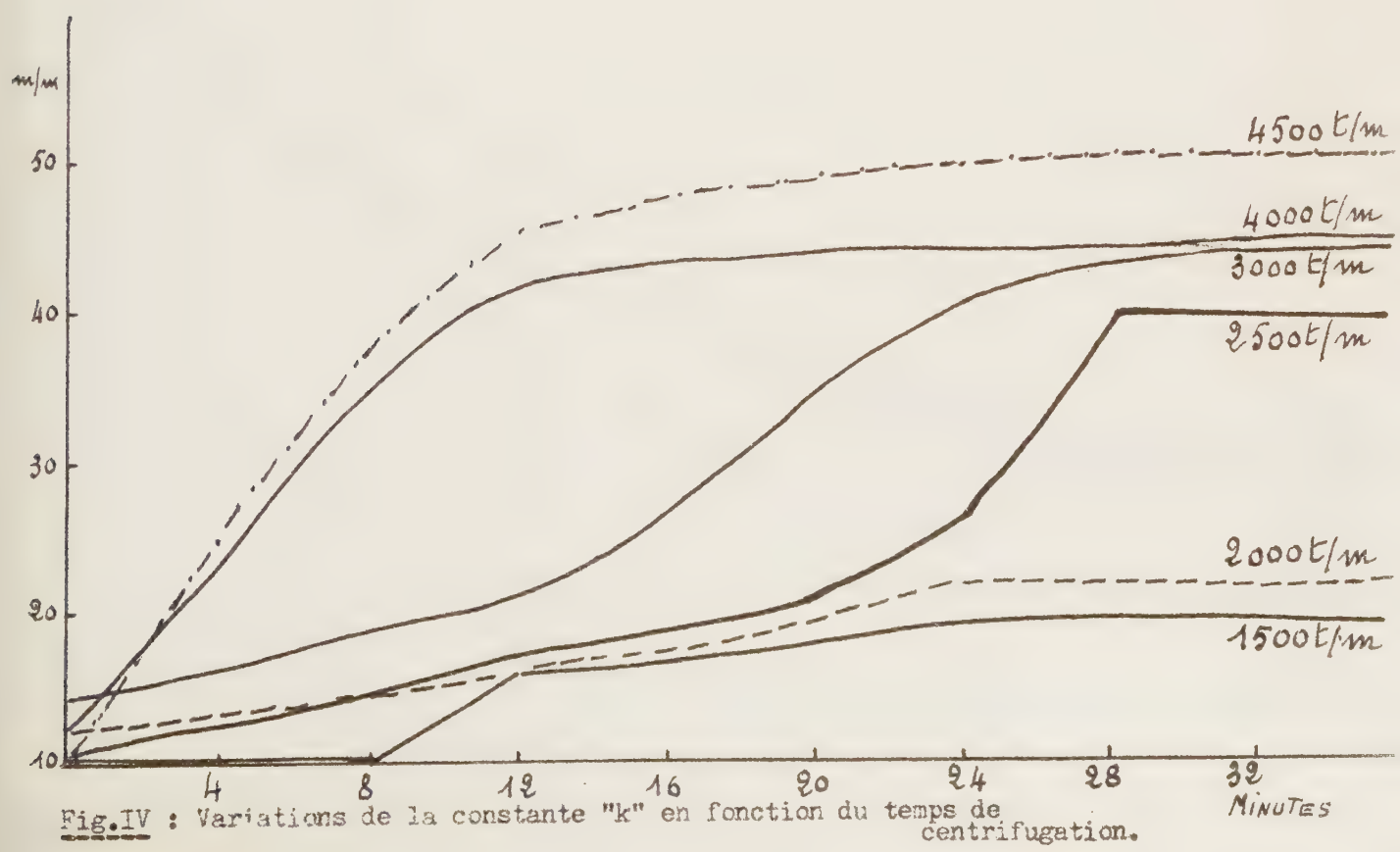
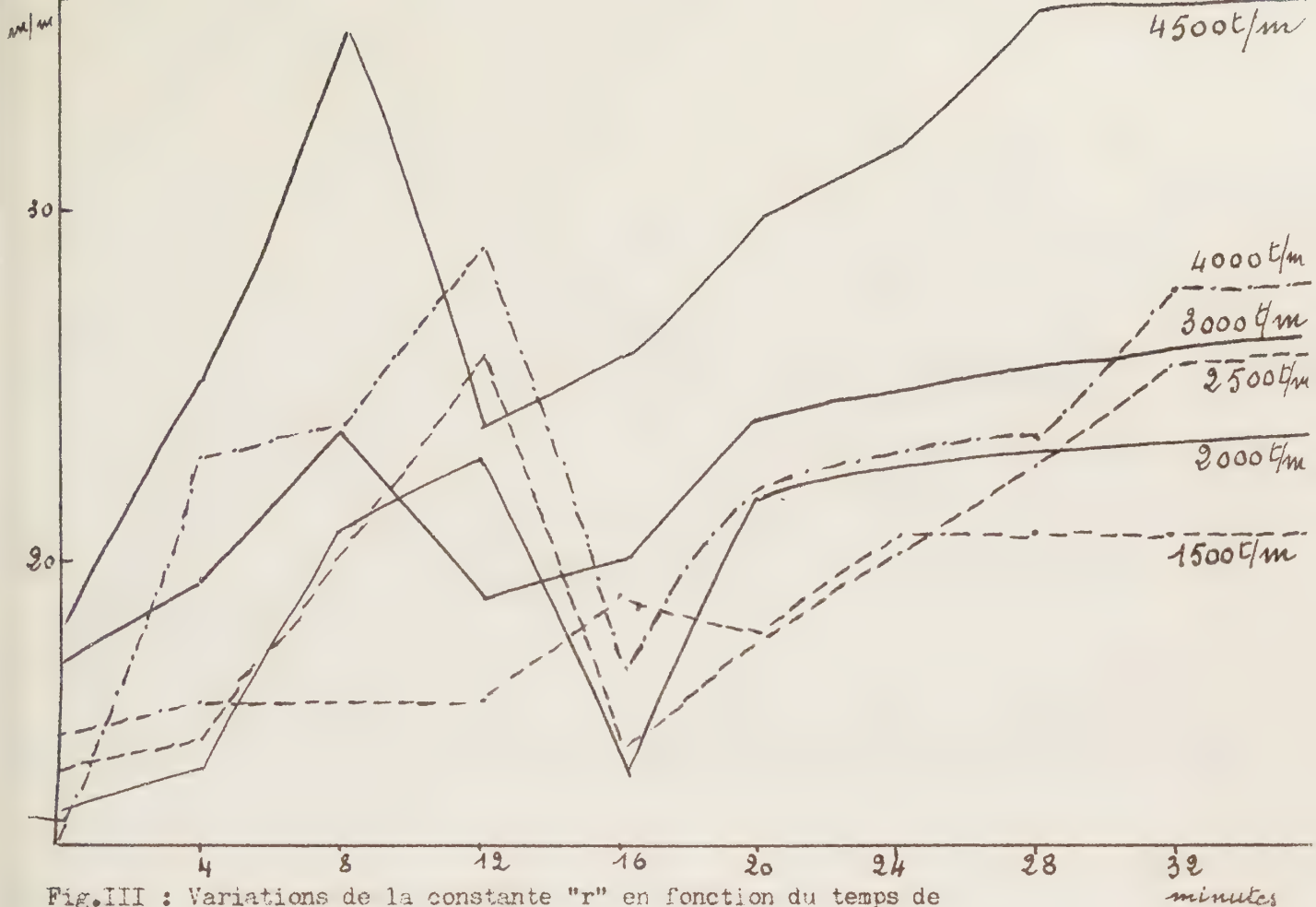
Elle suit les variations de la constante r avec allongement en deux temps.

Constante Am_1 (tableau 6)

A 1.500 t/mn, Am_1 commence à diminuer progressivement à partir de la huitième minute. Entre la seizième et la vingtième minute cette diminution se précipite et redevient plus lentement progressive ensuite.

A 2.000, 2.500 et 3.000 t/mn, la diminution de Am_1 est continue mais plus marquée dans les douze premières minutes et déjà nette après 4 minutes.

A 4.000 et 4.500 t/mn la valeur de Am_1 diminue très brutalement dès la quatrième minute, elle baisse encore nettement jusqu'à la douzième minute puis se stabilise.



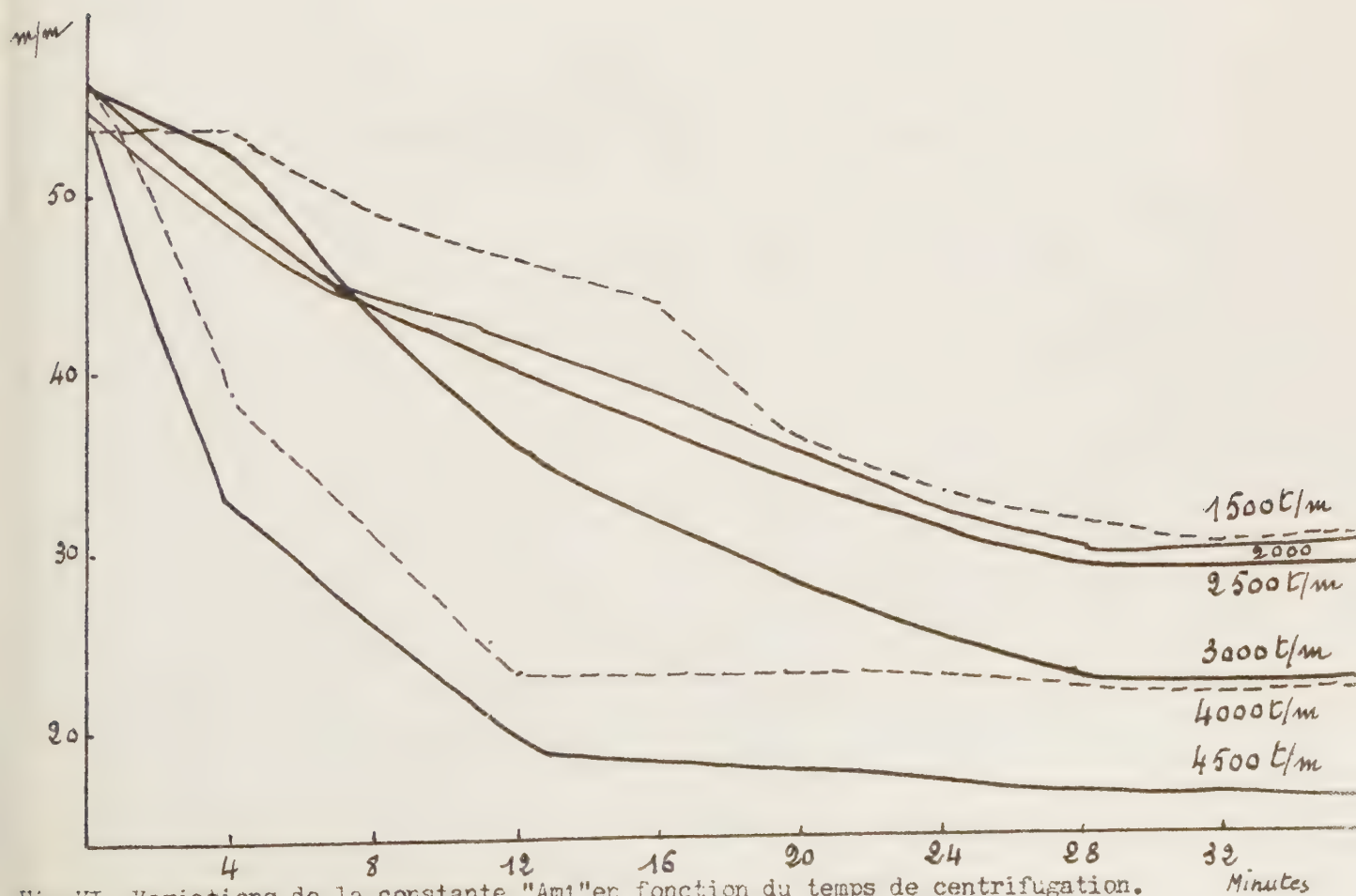
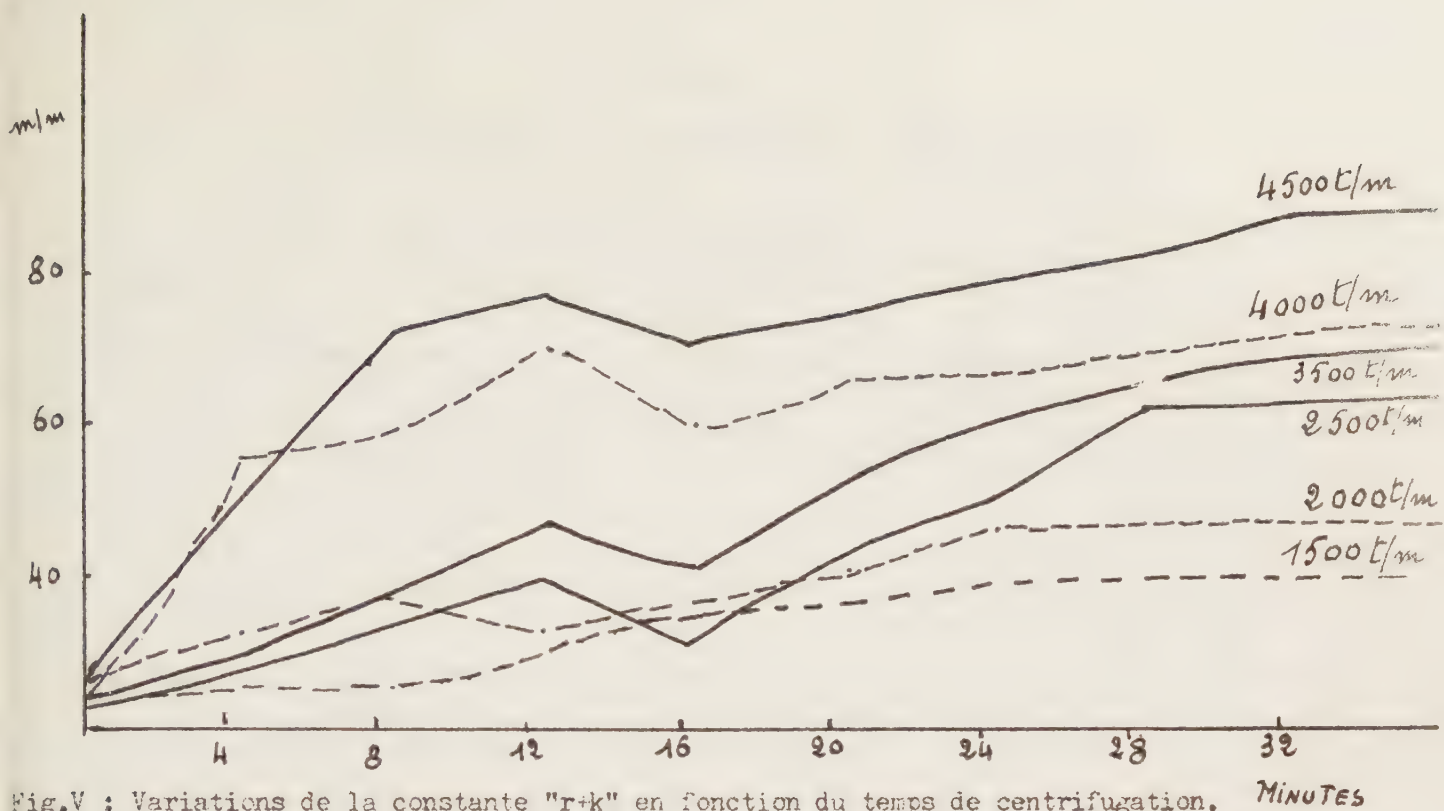


TABLEAU N° 3

VARIATIONS DE r EN FONCTION DE LA CENTRIFUGATION

Tours/minute	g	DUREE DE CENTRIFUGATION en minutes									
		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36
1.500	300	14,5	16	16	16	19,5	18,5	21,5	21,5	21,5	21,5
2.000	550	16,5	19,5	23,5	19	20	21,5	25	25,5	25,5	25,5
2.500	850	13	14	21	23	14	22	23	23	23,5	23,5
3.000	1.250	14,5	15	21	26	14,5	18,5	20,5	23	26	26
4.000	2.250	12	23	23,5	29	17	22	23	24	28	28
4.500	2.750	18	25	35	31	24	26	30	32	38	38

TABLEAU N° 4

VARIATIONS DE K EN FONCTION DE LA CENTRIFUGATION

Tours/minute	g	DUREE DE CENTRIFUGATION en minutes									
		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36
1.500	300	9,5	9,5	9,5	15,5	16	18	18,5	19	19	19
2.000	550	12,5	13,5	13,5	14	16	19,5	22	22	22	22
2.500	850	10,5	12	14	17	18	21	27	40	40	40
3.000	1.250	10,5	14	18	22	27	35	41	43	44	44
4.000	2.250	11,5	22,5	36	42	43	44	44	45	45	45
4.500	2.750	10	24	38	46	48	49	50	51	51	51

TABLEAU N° 5

VARIATION DE $r + k$ EN FONCTION DE LA CENTRIFUGATION

Tours/minute	g	DUREE DE CENTRIFUGATION en minutes									
		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36
1.500	300	24	25,5	25,5	31,5	35,5	36,5	40	40,5	40,5	40,5
2.000	550	27	33	37	33	36	41	47	47,5	47,5	47,5
2.500	850	23,5	26	35	40	32	43	50	63	63,5	63,5
3.000	1.250	24,5	29	39	48	41,5	53,5	61,5	66	70	70
4.000	2.250	23,5	55,5	59,5	71	60	66	67	69	73	73
4.500	2.750	28	49	73	77	72	75	80	83	89	89

TABLEAU N° 6

VARIATION DE A_{m1} EN FONCTION DE LA CENTRIFUGATION

Tours/minute	g	DUREE DE CENTRIFUGATION en minutes									
		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36
1.500	300	54	54	49	47,5	44	36	33,5	32	30	30
2.000	550	57	50	44	42	39	36	33	32	30,5	30
2.500	850	57	50	44	40	37,5	34	32	30	29,5	29
3.000	1.250	57	53	43,5	36	32,5	28	25,5	23,5	23	23
4.000	2.250	60	39	31	23,5	23,5	23,5	23	23	23	23
4.500	2.750	55	33	26,5	19,5	19	18	17	16	16	16

DISCUSSION -

Cet allongement de la constante r en deux temps paraît correspondre à une rupture mécanique de certaines plaquettes qui libèrent de la thromboplastine. D'ailleurs ce raccourcissement après un certain temps de centrifugation est d'autant plus net que le champ centrifuge appliqué est plus grand.

Dans les courbes de variation de k et de Am_1 on ne note pas d'aspect en deux temps comme dans celle de r . Ceci prouve qu'il s'agit bien dans le cas de r d'une rupture mécanique des plaquettes. On a donc intérêt à centrifuger d'abord lentement puis plus vite pour éviter autant que possible de casser les plaquettes et de libérer la thromboplastine.

Les chiffres obtenus confirment que toute centrifugation excédant 1.500 t/mn (300 g) ou effectuée à 1.500 t/mn pendant plus de 4 minutes altère les constantes du PRP aussi bien r , k , $r + k$, que Am_1 .

La sédimentation s'impose donc pour éviter d'altérer les plaquettes et en tout cas, aucune centrifugation ne doit dépasser une à deux minutes à 1.000 t/mn. Ceci confirme les travaux de Hartert (34 - 35) qui centrifuge à 1.000 t/mn, et ceux de Gagliardi (29) qui a signalé des altérations notables après centrifugation à 2.500 t/mn avec allongement de r et k et diminution de Am_1 .

Quant au PDP il est nécessaire pour l'obtenir de centrifuger au moins à 4 500 t/mn (2.750 g) pendant trente minutes au minimum : au-delà les valeurs de r , k et Am_1 restent constantes.

Les figures VII, VIII, IX et X nous montrent la différence entre deux centrifugations faites respectivement à 1.500 et 4.500 t/mn.

Cependant si l'on fait une numération des plaquettes dans un PDP obtenu comme nous venons de le préciser, on s'aperçoit qu'il en reste toujours une certaine quantité (variant entre 5 et 15.000/mm³), même si l'on double le temps de centrifugation. Il est donc important de se débarrasser de ces plaquettes non sédimentées par centrifugation en les altérant par deux ou trois congélations-décongélations successives du PDP.

Nous l'avons vérifié en enregistrant des diagrammes et en comptant les plaquettes avant et après une, deux et trois congélations-décongélations successives d'une série de PDP obtenue par centrifugation des PRP trente minutes à 4.500 t/mn.

La congélation se fait dans un mélange réfrigérant à $- 2^{\circ} \text{C}$ et est suivie d'une décongélation à 37°C .

Voici un exemple des résultats obtenus :

- PDP centrifugé vingt minutes à 4.500 t/mn

$Am_2 = 24$ Nombre de plaquettes = 15.000/mm³

- Après une première congélation

$Am_2 = 22$ Nombre de plaquettes = 10.000/mm³

- Après une seconde congélation

$Am_2 = 21 \frac{1}{2}$ Nombre de plaquettes = 5.000/mm³

- Après une troisième congélation

$Am_2 = 19$ Nombre de plaquettes = 1.000/mm³

Six expériences de ce type ont donné des résultats analogues.

Par contre la congélation à -80° dans un mélange de glace carbonique et d'éthanol, suivie de décongélation brutale au bain-marie à 37° , altère dès la première fois pratiquement toutes les plaquettes.

La même congélation-décongélation appliquée directement au PRP montre une altération rapide du diagramme, en rapport avec la diminution des plaquettes intactes.

Par exemple :

- Diagramme initial

$r = 14 \frac{1}{2}$

$r + k = 22$

$Am_1 = 56 \frac{1}{2}$

$Am_2 = 21 \frac{1}{2}$

$Ap = 35$

Nombre de plaquettes = 278.000/mm³

- Après la première congélation-décongélation

$r = 13 \frac{1}{2}$

$r + k = 21 \frac{1}{2}$

$Am_1 = 49$

$Ap = 27 \frac{1}{2}$

Nombre de plaquettes = 207.000/mm³

- Après la deuxième congélation-décongélation

$r = 10$

$r + k = 19$

$Am_1 = 40$

$Ap = 18 \frac{1}{2}$

Nombre de plaquettes = 145.000/mm³

- Après la troisième congélation-décongélation

$$r = 8$$

$$r + k = 15$$

$$Am1 = 32 \frac{1}{2}$$

$$Ap = 11$$

$$\text{Nombre de plaquettes} = 80.000/\text{mm}^3$$

Remarquons que dans nos expériences nous plongeons le tube de plasma dans le mélange réfrigérant à $- 2^{\circ} \text{C}$ pendant un temps très court suffisant pour obtenir la congélation. Dans ce cas le plasma seul est congelé tandis que les plaquettes résistent mieux que le plasma à la congélation, ne le sont pas.

Un certain nombre de plaquettes seulement sera donc altéré puisqu'après trois congélations-décongélation successives du PRP on en retrouve encore $80.000/\text{mm}^3$.

A $- 80^{\circ} \text{C}$ par contre, il se produit une congélation en masse : les plaquettes elles-mêmes sont alors congelées.

Il faut donc définir les conditions de congélation utilisées et congeler les plaquettes à une température aussi basse que possible si l'on veut les altérer tout de suite.

- CONCLUSION -

Pour obtenir un PDP il faut donc centrifuger le PRP pendant trente minutes à 4.500 t/mn (soit 2750 g) et lui faire subir ensuite trois congélations-décongélation successives pour se débarrasser totalement des plaquettes.

Lors de la centrifugation, certaines plaquettes cassent, provoquant un raccourcissement de r d'autant plus marqué que le champ centrifuge appliqué est plus grand. On a donc intérêt à centrifuger d'abord lentement, puis plus vite pour éviter autant que possible de casser les plaquettes et de libérer leur thromboplastine.

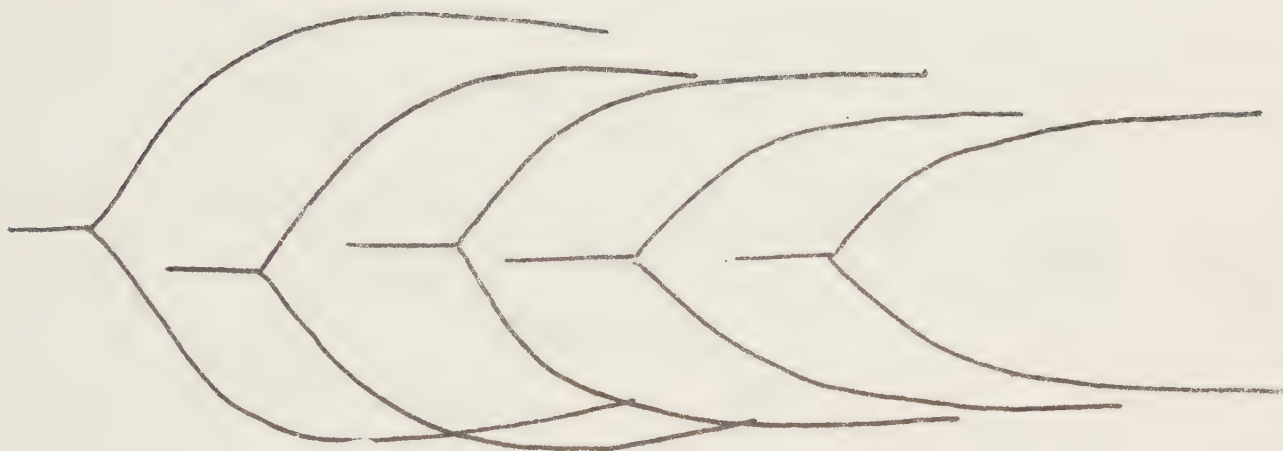


Fig. VII : Centrifugation d'un PRP à 1500 t/m pendant 4 - 8 - 12 - 16 minutes.



Fig. VIII : Centrifugation d'un PRP à 1500 t/m pendant 20 - 24 - 28 - 32 - 36 minutes.

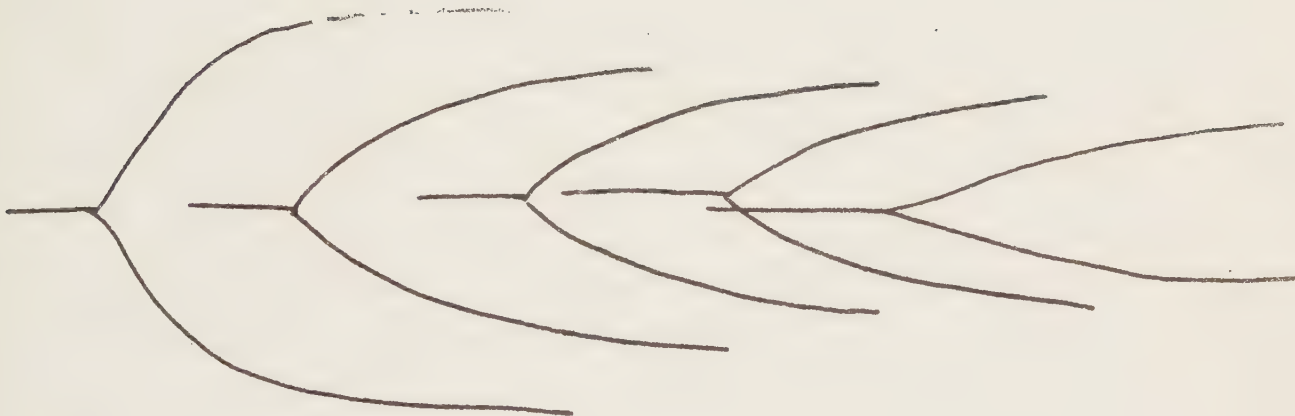


Fig. IX : Centrifugation d'un PRP à 4500 t/m pendant 4 - 8 - 12 - 16 minutes.

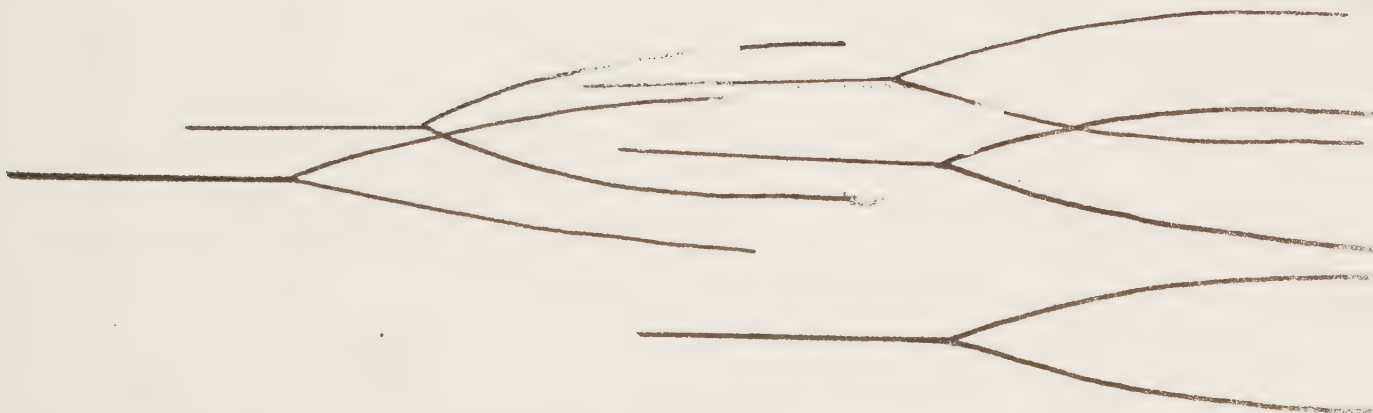


Fig. X : Centrifugation d'un PRP à 4500 t/m pendant 20 - 24 - 28 - 32 - 36 minutes.

CHAPITRE IV

* * * *

PREPARATION DE SUSPENSIONS PLAQUETTAIRES UTILISABLES EN THROMBODYNAMOGRAPHIE EXPERIMENTALE

Nous allons décrire nos études sur la préparation, à l'échelle du Laboratoire de recherche, de suspensions plaquettaires utilisables pour l'étude de la fonction thrombodynamique.

TECHNIQUE -

Le PRP centrifugé à 4.500 tours/minute pendant 30 minutes en tubes siliconés à 4° C se transforme en PDP et les plaquettes sédimentent sous forme d'un petit culot en général souillé de quelques hématies et leucocytes.

Pour plus de commodité dans les prélèvements nous avons d'abord essayé de récupérer les plaquettes intactes du PRP citraté et de les remettre en suspension soit dans du PDP, soit dans du tampon véronal-acétate à pH 7,35 dit "tampon d'Owren-Koller" * dont la formule est dérivée de celle du tampon de Michaelis.

Nous avons échoué car lorsqu'on tente de remettre les plaquettes citratées en suspension, le culot se désagrège en petits amas que l'on ne parvient pas à dissocier.

Zucker et Borelli (112) avaient noté que 70 % des plaquettes d'un sang recueilli sur citrate sont des plaquettes d'irritation, de forme dendritique, munies de spicules, morphologiquement aptes à l'adhésivité et à l'agglutination et qui s'altèrent au contact du matériel lors des manipulations ; on en perd donc beaucoup.

L'enregistrement des diagrammes montre bien que ces plaquettes séparées du plasma citraté et remises en suspension dans du PDP ne sont plus disponibles pour l'activité thrombodynamique. Nous n'avons pu obtenir des diagrammes normaux dans ces conditions que de façon exceptionnelle et non reproductible.

Nous avons donc été obligés de nous adresser à des sangs recueillis sur EDTA (sel disodique de l'acide éthylène-diamine-tetracétique). Nous avons utilisé le Complexon III à 1,5 p. 100 à raison d'une partie pour quatre de sang, de façon à conserver les mêmes conditions de dilution que lors des examens thrombodynamiques ordinaires.

On sait que l'EDTA est l'anticoagulant de choix pour la conservation des plaquettes : les formes dendritiques sont alors peu nombreuses et les plaquettes ont une morphologie sphérique, elles sont transitoirement bloquées sous une forme

* Composition du Tampon véronal-acétate à pH 7,35, dit tampon d'Owren-Koller -

<u>Solution A</u>	-	Acétate de sodium	9,714 g
		Véronal sodique	14,714 g
		Eau distillée	500 ml

<u>Solution B</u>	-	Solution A	250 ml
		Solution NaCl 4,25 p. 100	200 ml
		HCl N/10	217 ml
		Eau distillée	683 ml

dite "de repos". Cette modification est réversible puisqu'en l'absence d'EDTA les plaquettes peuvent reprendre une forme discoïdale et retrouver leur activité biologique.

Cette inaptitude temporaire à l'adhésivité et à l'agglutination permet donc la manipulation des plaquettes impossible en sang citraté.

Comme l'ont démontré Zucker et Borelli (111 & 112) & Quick et Triantaphylopoulos (105), l'EDTA se comporte comme une antithrombine mais cette inhibition ne se manifeste qu'après incubation ou aération du plasma.

Nous avons utilisé seulement l'EDTA pour le prélèvement à partir duquel nous recueillons les plaquettes. Nos suspensions plaquettaires étant finalement lavées en solution tampon il ne peut donc rester que des traces insignifiantes d'EDTA au moment des enregistrements thrombodynamographiques. Ces traces ne modifient pas les constantes des diagrammes pour leur propre compte. Nous avons d'ailleurs pris le plus grand soin de nous en assurer.

Nous faisons donc deux prélèvements simultanés : l'un sur citrate, l'autre sur complexon. Le prélèvement sur citrate nous fournit le PRP témoin et le PDP substrat. Le prélèvement sur complexon nous sert à préparer des suspensions plaquettaires.

Une certaine quantité de PRP prélevée sur EDTA est centrifugée puis on retourne le tube pour se débarrasser de PDP surnageant et on essuie soigneusement les parois avec du papier filtre.

Nous avons essayé différentes méthodes de remise en suspension du culot plaquettaire. Agitation en présence de ballotinies en verre siliconées ou non ; dilacération prudente avec un agitateur en verre ou en bois. Elles n'ont donné aucune satisfaction.

La meilleure façon de procéder consiste à frotter empiriquement une dizaine de fois le tube sur la plaque d'un portoir percé de trous (portoir à tube à hémolyse) pour favoriser la dispersion du culot avant de lui ajouter du PDP citraté. Puis on remet le culot progressivement en suspension dans une quantité de PDP citraté homologue égale à la quantité de PRP centrifugé précédemment. Ainsi on conserve la concentration plaquettaire initiale. Ce tour de main dont nous avons déjà une grande expérience, puisque plus de 300 essais ont été pratiqués dans ces conditions, s'est révélé le seul convenable et reproductible (Fig. XI).

DISCUSSION DES RESULTATS -

Nous avons comparé les valeurs des constantes r , $r + k$, et A_m du

PRP citraté de l'individu dont proviennent les plaquettes et celles obtenues avec le PDP homologue replaqueté comme nous venons de le dire.

Pour ce faire, nous avons utilisé les lois générales de la statistique qui permettent de juger la valeur des résultats individuels et généraux provenant d'un ensemble de mesures similaires pratiquées en série dans les mêmes conditions de technique.

Si l'ensemble de la statistique porte sur n mesures du même type, on peut en tirer une moyenne M égale à la somme de chaque mesure individuelle divisée par n . Chaque mesure individuelle diffère de la moyenne en plus ou en moins, par un "écart à la moyenne" : e qui la caractérise. Connaissant ces éléments il devient possible de calculer un écart type ou dérivation standard : D par la formule :

$$D = \frac{\sum e^2}{n - 1}$$

dans laquelle $\sum e^2$ est la somme arithmétique des écarts individuels à la moyenne portés au carré.

Dans une statistique idéale les valeurs individuelles se répartissent selon les lois de la probabilité en deçà et au-delà de la valeur moyenne. Si l'on porte en abscisse ces valeurs et en ordonnée le nombre de fois où chacune a été observée, on obtient idéalement une courbe en cloche symétrique par rapport à un axe vertical passant par la valeur moyenne la plus fréquente. La loi de distribution ainsi représentée est telle que l'écart à la moyenne est inférieur ou égal à la dérivation standard D pour 70 % au moins des mesures individuelles et inférieur ou égal à $2 D$ dans 95 % des cas. En théorie les valeurs ainsi étudiées par statistique ont donc des variations extrêmes très peu différentes de $M \pm 2D$.

Si nous considérons les chiffres du tableau suivant (tableau 7) nous voyons qu'ils répondent à tous les critères statistiques exigés.

CONCLUSION -

Nous avons adopté une technique de séparation des plaquettes à partir d'un PRP recueilli sur Complexon. Nous utilisons un certain nombre tour de main pour favoriser la dispersion du culot. Puis nous remettons des plaquettes en suspension dans une quantité de PDP citraté homologue de façon à obtenir la concentration plaquettaire initiale.

La comparaison des diagrammes de PRP citraté et de PDP homologue replaqueté montre que cette technique est valable et reproductible.

Tableau n° 7

- ETUDE STATISTIQUE DES CONSTANTES GRAPHIQUES DE 300 P R P NORMAUX ET
COMPARAISON AVEC LES CONSTANTES DE LEURS P D P REPLAQUETTES -

PRP -

Constantes	Moyennes	Déviations Standard (D)	Pourcentages d'écart à la moyenne (e $\leq$ D)	Variations Théoriques M $\pm$ 2D	extrêmes Observées
r	16	2,96	76 %	10 à 22	10 à 25
k	8,5	1,85	75 %	4,5 à 12,5	3,5 à 13
r + k	24,5	3,65	75 %	17,5 à 31,5	16 à 31
$\frac{r}{k}$	1,9	0,35	75 %	1,2 à 2,6	1,5 à 3,5
Am ₁	55,5	6,3	75 %	43 à 68	45 à 69

PDP replaqueté -

r	14	2,85	75 %	8 à 20	8 à 27
k	7,5	1,75	76 %	4 à 11	3 à 14
r + k	21,5	3,3	75 %	15 à 28	13 à 30
$\frac{r}{k}$	1,85	0,34	75 %	1,2 à 2,6	1,2 à 4
Am ₁	57	6,6	76 %	44 à 70	41 à 70

PRP + PDP replaqueté -

r	15	2,9	76 %	9 à 21	8 à 27
k	8	1,8	75 %	4 à 12	3 à 14
r + k	23	3,5	75 %	16 à 30	13 à 32
$\frac{r}{k}$	1,85	0,35	75 %	1,2 à 2,6	1,2 à 4
Am ₁	56,5	6,5	76 %	43,5 à 69,5	41 à 70

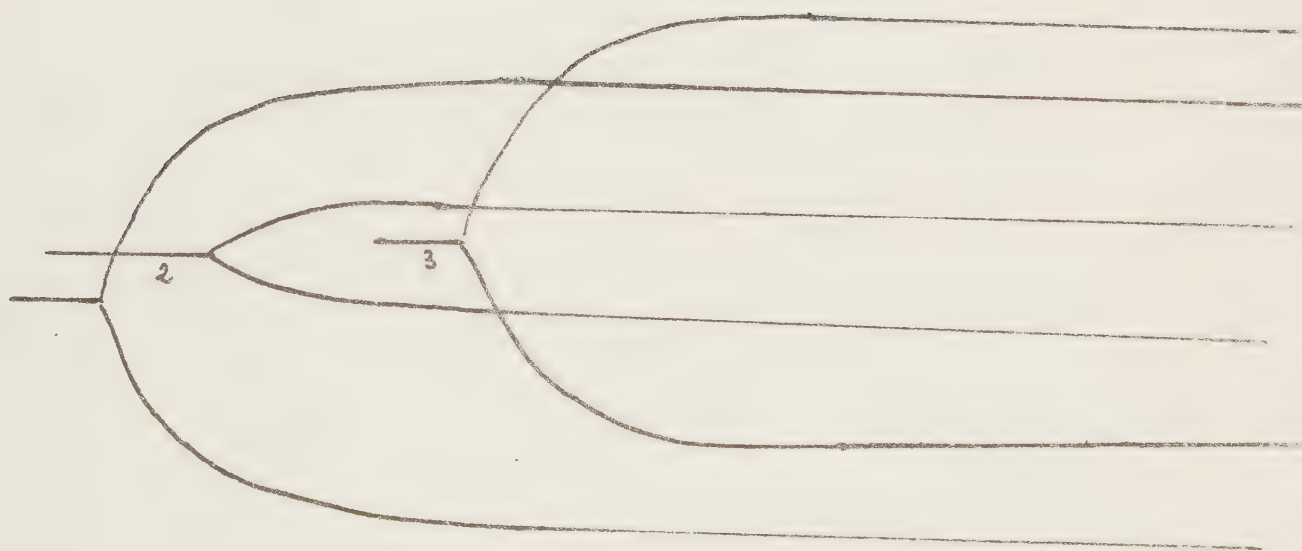


Fig. XI

- | | | |
|---|---|----------------|
| 1 | = | PRP |
| 2 | = | PDP |
| 3 | = | PDP replaqueté |

CHAPITRE V

* * *

EFFET DU NOMBRE DES PLAQUETTES THROMBODYNAMIQUES SUR L'AMPLITUDE MAXIMA DES DIAGRAMMES DE P. R. P.

Nous allons envisager l'influence du nombre des plaquettes sur l'amplitude maxima des diagrammes. Pour cela nous utiliserons deux types d'expériences :

- Appauvrissement en plaquettes d'un PRP par dilution dans son PDP
- Enrichissement progressif en plaquettes d'un PDP citraté.

1 - EXPERIENCES D'APPAUVRISSEMENT -

Connaissant maintenant les conditions exactes de préparation d'un PDP, nous l'avons préparé selon les techniques décrites et l'avons utilisé pour diluer progressivement le PRP dont il provient dans le but d'appauvrir ce dernier en plaquettes.

Nous enregistrons toujours un diagramme de référence du PRP et du PDP et pour chaque plasma on établit le nombre de plaquettes et le taux du fibrinogène.

Résultats -

- L'appauvrissement d'un plasma normal en ses plaquettes provoque une diminution progressive de la constante Am1, plus nette au-dessous de 150.000/mm³ * (fig. XII - XIII).

Dans nos 30 expériences d'appauvrissement, nous observons les chiffres suivants :

Nombre des Plaquettes/mm ³	Valeurs de l'amplitude maxima en mm	
	Moyennes	Extrêmes
50.000	38	30 - 42
100.000	45	39 - 52
200 000	55	48 - 59
300 000	57	52 - 62,5

* Le nombre des plaquettes est donné par millimètre cube de sang.

- Les constantes chronométriques varient aussi mais à partir d'un appauvrissement en plaquettes plus important.

La variation la plus précoce porte sur k . Dès que le nombre des plaquettes devient inférieur à $120.000/\text{mm}^3$, k s'allonge nettement et cet allongement augmente rapidement quand le chiffre des plaquettes continue à décroître, témoignant d'un déficit progressif de la génération de la thrombine. k peut atteindre des valeurs égales à 70 ou 80 mm.

La constante r reste subnormale tant que le nombre des plaquettes est supérieur à $50.000/\text{mm}^3$. Puis r commence à s'allonger mais toujours dans des proportions beaucoup moins importantes que k atteignant tout au plus le double de sa valeur initiale pour un nombre de plaquettes très bas.

- Au-dessus de $100.000/\text{mm}^3$ les constantes de rétraction sont très peu modifiées puis elles évoluent rapidement vers 0 traduisant l'irrétactilité du caillot. Cependant une ébauche de rétraction persiste encore pour des chiffres de plaquettes voisins de $50.000/\text{mm}^3$ puis la rétraction disparaît totalement.

Les 30 expériences pratiquées nous ont permis de tracer les courbes de variations de Am_1 et de Ap en fonction de l'appauvrissement en plaquettes (Fig. XIV et XV).

2 - EXPERIENCES D'ENRICHISSEMENT -

Des expériences d'enrichissement en plaquettes d'un PDP citraté ont été faites parallèlement ; pour ce faire, nous avons utilisé deux types de suspensions plaquettaires :

- des suspensions plaquettaires que nous avons préparées dans notre Laboratoire selon la méthode précédemment décrite ;

- des suspensions de plaquettes fraîches pratiquement exemptes de contamination par les autres éléments figurés préparés par le Médecin Colonel Maupin au Centre de Transfusion de l'Armée par la méthode de Maupin et Chary (70) adaptée aux besoins de la transfusion. Ces suspensions qu'il nous a aimablement fournies titraient $30.000.000$ de plaquettes/ mm^3 .

Avec ces deux types de préparations nous avons enrichi progressivement en plaquettes des PDP citratés de façon à obtenir des concentrations plaquettaires variant de 10.000 à $20.000.000/\text{mm}^3$.

Nous enregistrons toujours un diagramme de référence du PDP et pour chaque plasma on établit le nombre des plaquettes et le taux du fibrinogène.

Résultats -

- Entre 10.000 et 50.000 plaquettes on note une augmentation progressive et importante de l'amplitude maxima.

- De 50.000 à 100.000 plaquettes/mm³ la valeur de Am¹ continue à croître de façon très importante.

- Au-delà de 100.000 plaquettes/mm³, certes la pente de la courbe de variation de Am devient moins rapide et moins importante mais l'accroissement de Am reste encore très nette puisque nous notons sur 35 expériences d'enrichissement les valeurs suivantes :

Nombre des Plaquettes/mm ³	Valeurs de l'amplitude maxima en mm	
	Moyennes	Extrêmes
50 000	40	32 - 45
100 000	48	42 - 51
200 000	54	50 - 57
300 000	58	54 - 61
400 000	61	56 - 64
500 000	63	58 - 66

- Pour des chiffres de plaquettes compris entre 500.000 et 1.500.000/mm³, l'amplitude maxima croît encore passant de 63 à 67 mm.

- Au-delà, apparaissent des hyperrétractilités avec des images "en goulot" (Fig. XVI).

Certes, en pathologie, on constate que l'apparition des images "en goulot" est beaucoup plus précoce (61 - 62 - 63). Mais les conditions ne sont pas comparables. En effet, dans nos expériences les plaquettes subissent un certain nombre

de manipulations qui en altèrent une certaine quantité. D'autre part en pathologie les images "en goulot, spécifiques des plaquettes, sont aussi conditionnées par le degré d'hyperleucocytose. Or dans nos conditions d'expérience seules évidemment les plaquettes sont en cause.

Au-delà de $3.000.000/\text{mm}^3$, si l'on poursuit l'enrichissement en plaquettes on obtient encore des images en goulot avec diminution progressive de l'amplitude maxima et finalement pour des enrichissements extrêmes : $10.000.000$ et plus, la valeur de l'amplitude maxima continue à diminuer tandis que les phénomènes de goulot disparaissent et que l'on obtient finalement une image de thromboadynamie avec arétractilité identique à celle réalisée par l'absence de plaquettes (Fig. XVII).

- La constante r se raccourcit progressivement puis revient à la normale entre 50.000 et $75.000/\text{mm}^3$.

La constante k ne se répare qu'un peu plus tard pour des chiffres voisins de 100.000 plaquettes/ mm^3 .

Les constantes r et k varient peu entre 100.000 et 500.000 plaquettes/ mm^3 mais au-delà on note un raccourcissement très net de r et k qui s'accentuera aux plus fortes concentrations lorsqu'on obtient des images en goulot. Puis de nouveau aux très hautes concentrations plaquettaires r et k s'allongeront.

- La rétraction s'ébauche quand le nombre des plaquettes atteint 50.000 à $70.000/\text{mm}^3$ puis elle redevient vite normale.

D'après les 35 expériences réalisées nous avons établi une courbe moyenne des variations de Am_1 et Ap en fonction du nombre des plaquettes (Fig. XVIII et XIX).

DISCUSSION -

Il existe certes des variations individuelles notables mais dans tous les cas les courbes présentent la même allure exponentielle. Nous avons retrouvé les courbes présentées par Hartert (34 - 35) M.E. Leroux (49) et de Nicola (22).

Nous sommes ainsi d'accord avec ces auteurs aussi bien pour les valeurs de la constante Am_1 en général que sur les variations de cette constante en fonction du nombre des plaquettes, alors que pour Prost (81) l'influence des plaquettes sur l'amplitude maxima est surtout évidente entre 0 et 100.000/mm³ et devient négligeable au-delà.

Au total l'augmentation du nombre des plaquettes augmente la fonction thrombodynamique, l'exacerbe puis l'abolit.

- CONCLUSION -

Le gradient de l'augmentation de l'amplitude maxima décroît avec le nombre de plaquettes surtout à partir de 100.000/mm³, mais contrairement à certaines publications ne s'annule jamais.

D'après nos expériences il est certain que les plaquettes influencent la valeur de l'amplitude maxima entre 100.000 et 300.000/mm³ puisqu'en moyenne nous avons une variation de 10 mm et que la courbe ne devient asymptotique que pour des valeurs en général supérieures à 1.500.000 plaquettes/mm³ ou en tous cas jamais dans aucune expérience pour un nombre de plaquettes inférieur à 1.000.000 par mm³.

L'augmentation de Am_1 est donc bien due à une hyperplaquettose quand Am_2 et le taux de fibrinogène sont normaux. Il est donc intéressant en pathologie de noter les variations d'amplitudes maxima pour des chiffres de 100.000 à 300.000 plaquettes/mm³ connaissant, bien sûr, le taux du fibrinogène et l'amplitude du PDP.

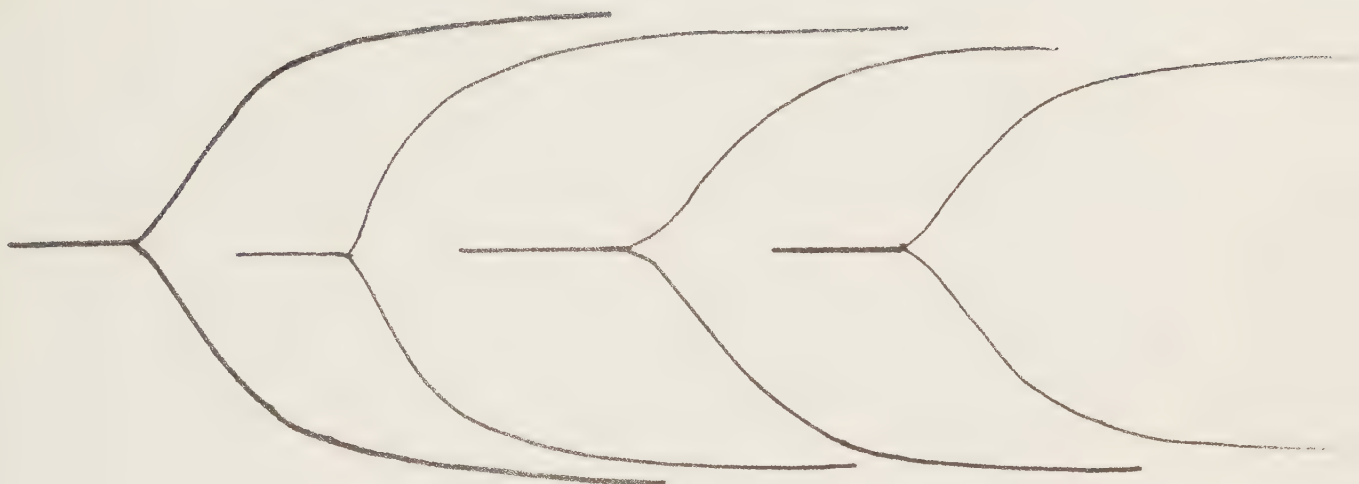


Fig. XII : Appauvrissement progressif d'un PRP en plaquettes
(400.000 - 300.000 - 250.000 - 200.000 pl./mm³.)



Fig. XIII : Appauvrissement progressif d'un PRP en plaquettes
(100.000 - 50.000 - 25.000 - 12.000 pl./mm³.)



Fig. XIV : Variations de A_{m1} en fonction du nombre des plaquettes.

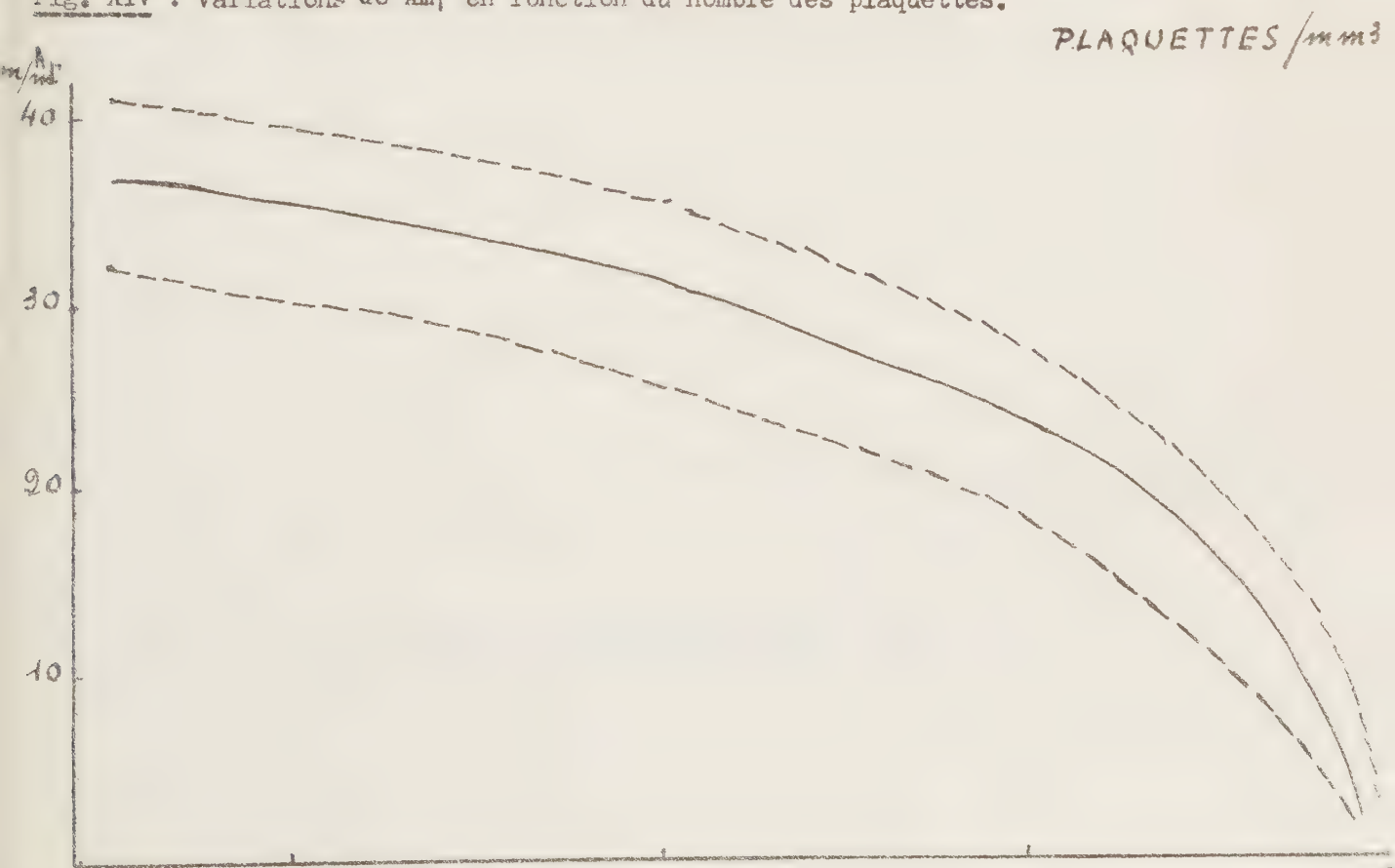


Fig. XV : Variations de A_p en fonction du nombre des plaquettes.

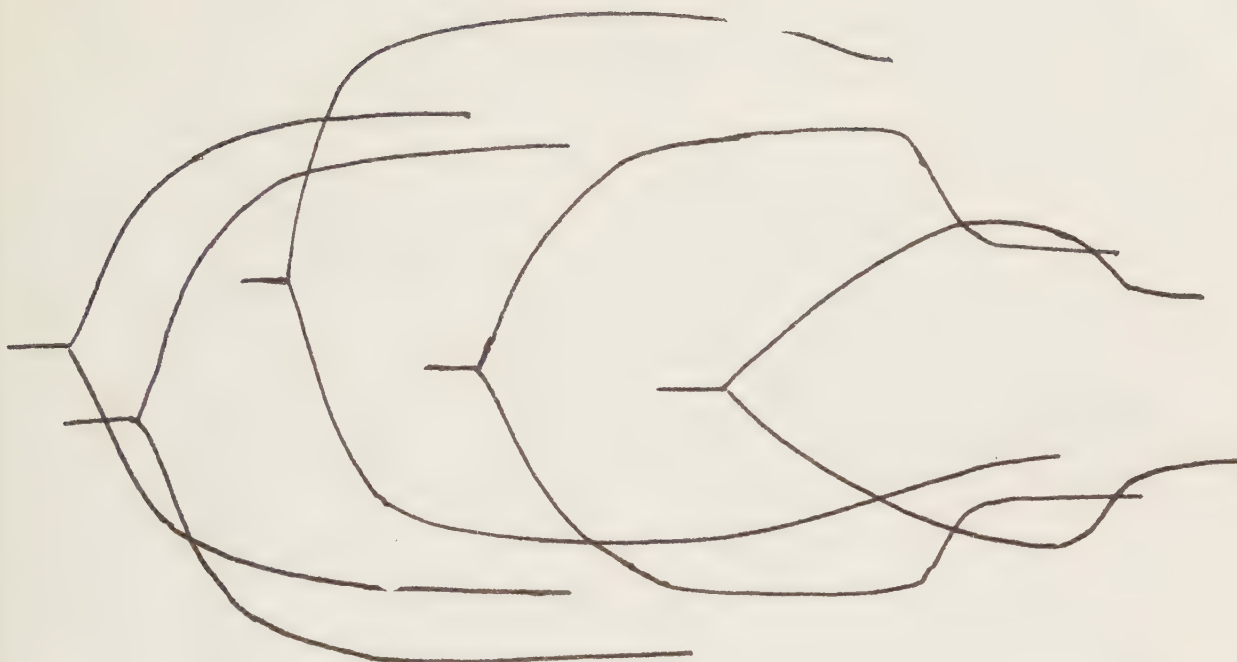
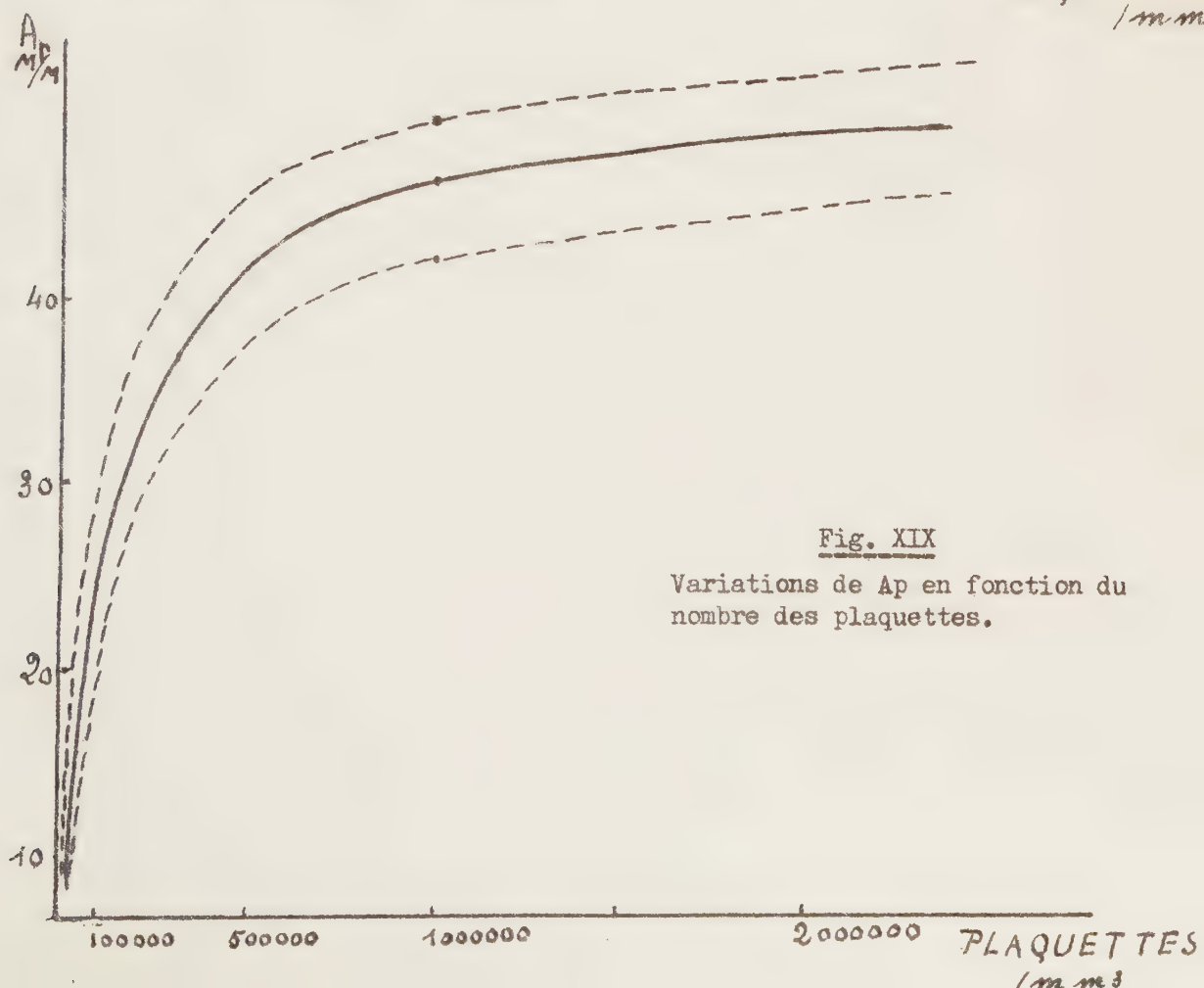
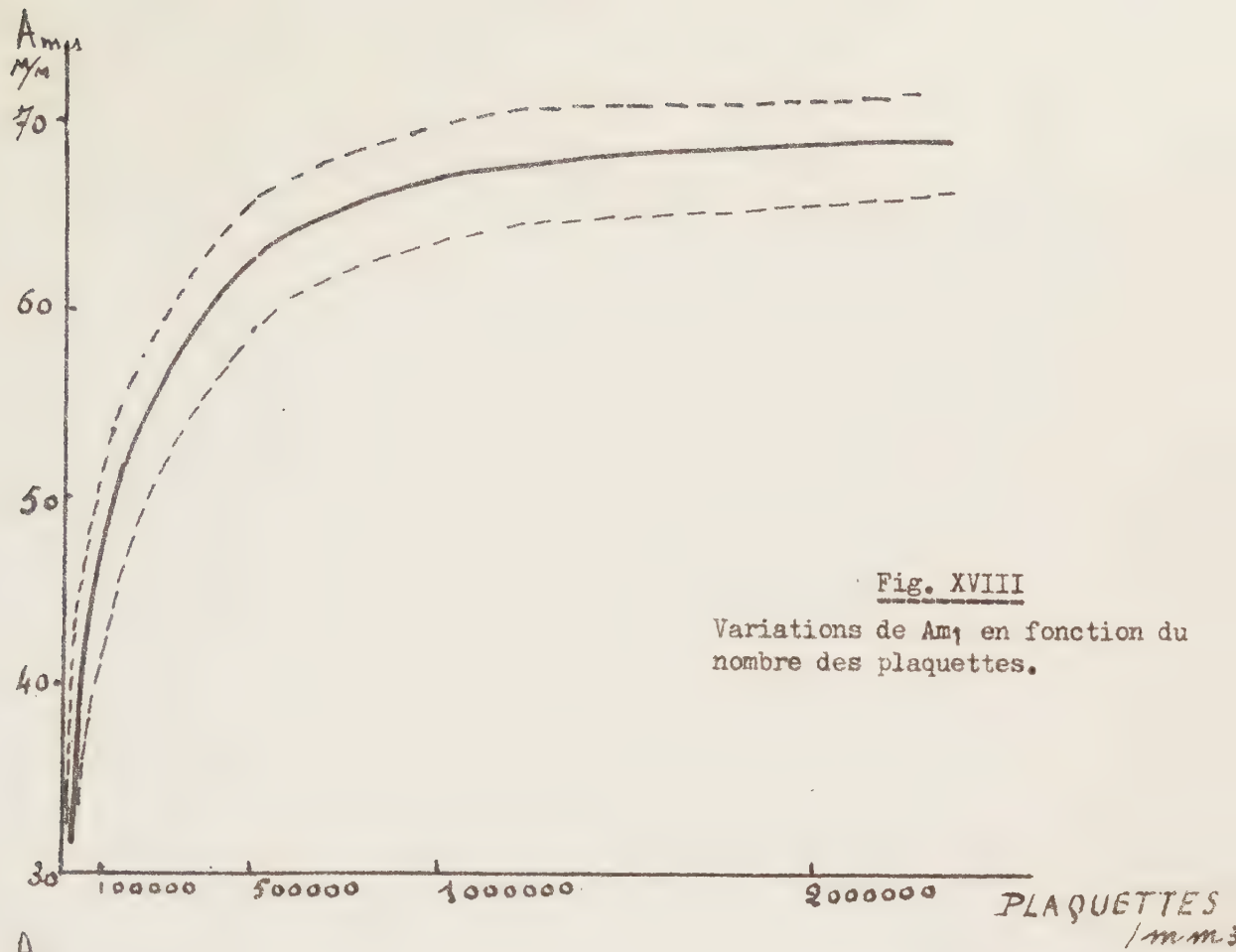


Fig. XVI : Enrichissement plaquettaire progressif d'un PDP
(500.000 - 1.000.000 - 2.000.000 - 4.000.000 - 5.000.000 de pl./mm³)



Fig. XVII : Enrichissement plaquettaire progressif d'un PDP
(6.000.000 - 8.000.000 - 12.000.000 - 16.000.000 pl./mm³)



CHAPITRE VI

DEVENIR DE LA FONCTION THROMBODYNAMIQUE DES PLAQUETTES APRES LAVAGE ET INCUBATION

1- LAVAGE -

Nous nous sommes proposé de faire subir cette manipulation aux plaquettes pour savoir combien de lavages on peut leur faire subir sans altérer leur fonction thrombodynamique.

Il peut être en effet utile et nécessaire de faire subir des lavages aux plaquettes dans les expériences ayant pour but de débarrasser de l'atmosphère plasmatique péri-plaquettaire dont l'importance a été mise en évidence par de nombreux auteurs (87 - 88 - 27 - 5).

TECHNIQUE -

Les plaquettes séparées à partir d'un plasma recueilli sur EDTA (Complexon III) selon la méthode précédemment décrite sont remises en suspension saline à pH 7,35 dans du tampon véronal-acétate contenant 1,5 p. 100 de Complexon.

On centrifuge trente minutes à 4.500 t/mn en tubes siliconés, à 4° C, puis on fait un second lavage en tampon et ainsi de suite jusqu'à un maximum de dix lavages. Finalement les plaquettes sont remises en suspension dans le PDP citraté du sang dont on les a tirées.

Un diagramme est enregistré après chaque lavage et comme contrôle on enregistre en même temps le diagramme

- du PRP
- du PDP
- du PDP replaqueté directement par des plaquettes non lavées.

On examine à chaque fois la morphologie des plaquettes au microscope en contraste de phase.

Dix expériences de ce type nous ont permis d'établir les chiffres des variations de r , $r + k$, Am_1 en fonction du nombre de lavages subis et nous en avons tiré des courbes individuelles et une courbe moyenne (Fig. XX, XXI).

RESULTATS -

Constante r : Dès le 1er lavage r se raccourcit nettement mais ensuite sous l'influence des lavages ultérieurs on n'observe plus de modifications sensibles.

Constante k : Elle présente les mêmes variations que la constante r.

Constante Am1 :

Elle augmente légèrement après le premier lavage, reste stable jusqu'au troisième puis s'effondre et se stabilise de nouveau après le cinquième lavage. Dès le troisième lavage l'examen des plaquettes au microscope à contraste de phase montre l'apparition d'anomalies morphologiques : paquets d'agrégation plaquettaire, filaments de fibrine adhérant à des plaquettes isolées ayant un aspect en fuseau ; tandis que d'autres plaquettes prennent un aspect vacuolisé. Plus on fait subir de lavages aux plaquettes plus on voit de fragments sans morphologie descriptive.

DISCUSSION -

Plus on lave les plaquettes plus on altère leur fonction thrombodynamique à cause des altérations morphologiques que leur font subir les manipulations et à cause de la perte des facteurs plasmatiques de l'atmosphère péri-plaquettaire, qui se libèrent progressivement dans les eaux de lavage où l'on peut d'ailleurs les caractériser. Cependant le premier lavage exalte la fonction thrombodynamique probablement parce que de nombreuses plaquettes présentent des formes d'irritation, ce que l'on voit au contraste de phase, et probablement aussi parce que des réactions ont pu se produire dans l'atmosphère plasmatique péri-plaquettaire dont les facteurs sont encore présents après le premier lavage.

Les deuxième et troisième lavages provoquent des altérations encore minimes de la fonction thrombodynamique ; à partir du quatrième lavage ces altérations deviennent considérables.

- CONCLUSION -

Il est donc possible d'étudier en thrombodynamographie les suspensions plaquettaires lavées une, deux ou trois fois, sachant que leur activité thrombodynamique est très légèrement augmentée par rapport aux plaquettes natives après un lavage, très légèrement diminuée après deux et trois lavages ; sachant aussi qu'après le quatrième lavage jusqu'au dixième il reste encore une certaine activité thrombodynamique mais qu'on ne peut plus se servir des plaquettes pour l'étude thrombodynamique.

2- INCUBATION DES PLAQUETTES -

Nous avons voulu étudier les conditions dans lesquelles on peut incuber les plaquettes sans provoquer de modification des valeurs des différentes constantes.

a) Incubation des plaquettes en tampon véronal-acétate :

TECHNIQUE -

Les plaquettes sont séparées du sang normal prélevé sur Complexon tandis que le PDP substrat provient du même sang recueilli sur citrate.

Les plaquettes remises en suspension dans du tampon véronal-acétate en matériel siliconé sont incubées dans trois conditions de température : 37° , 18° et 4° , pendant un temps variant d'une demi-heure à six heures.

Puis on les sépare du tampon et on les remet en suspension en nombre normal dans le PDP citraté et on enregistre un diagramme toutes les demi-heures. Comme contrôle, on enregistre toujours un diagramme - du PRP
- du PDP
- du PDP replaqueté directement avec des plaquettes non incubées.

Nous avons étudié les variations de r , k , et de $Am1$, dans quinze expériences de ce type. Les courbes obtenues montrent l'existence de sensibilité individuelles : cependant les variations ayant toutes lieu dans le même sens, des courbes moyennes ont pu être établies (Fig. XXII, XXIII).

RESULTATS -

Constante r

- Après incubation à 4° : r reste stable pendant 2 heures $\frac{1}{2}$ et diminue très légèrement ensuite.
- Après incubation à 18° : r reste stable pendant 1 heure puis s'allonge très lentement.
- Après incubation à 37° : C'est à cette température que l'on note les modifications les plus importantes : après la première $\frac{1}{2}$ heure r s'allonge puis diminue et baisse très rapidement après 1 heure $\frac{1}{2}$ d'incubation.

Constante k : Elle suit les mêmes variations.

Constante $Am1$

Quelle que soit la température $Am1$ passe par un maximum après une heure d'incubation, surtout à 4° et à 18° , $Am1$ revient à sa valeur normale après une heure $\frac{1}{2}$ d'incubation et reste stable. A 37° , $Am1$ augmente rapidement jusqu'à la troisième heure puis diminue ensuite lors des incubations de plus longue durée.

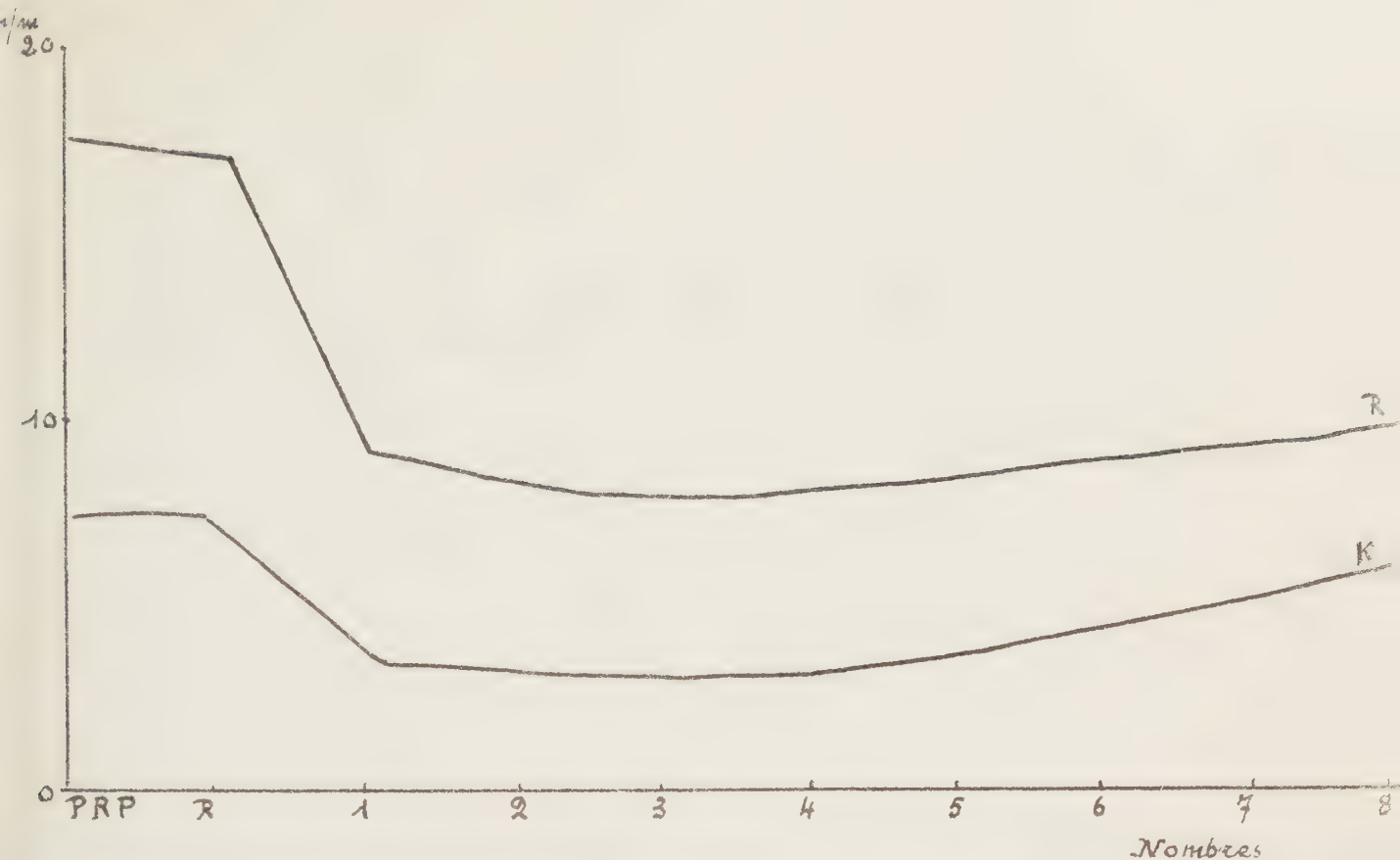


Fig. XX : Variations des constantes r et k en fonction du nombre de lavages.

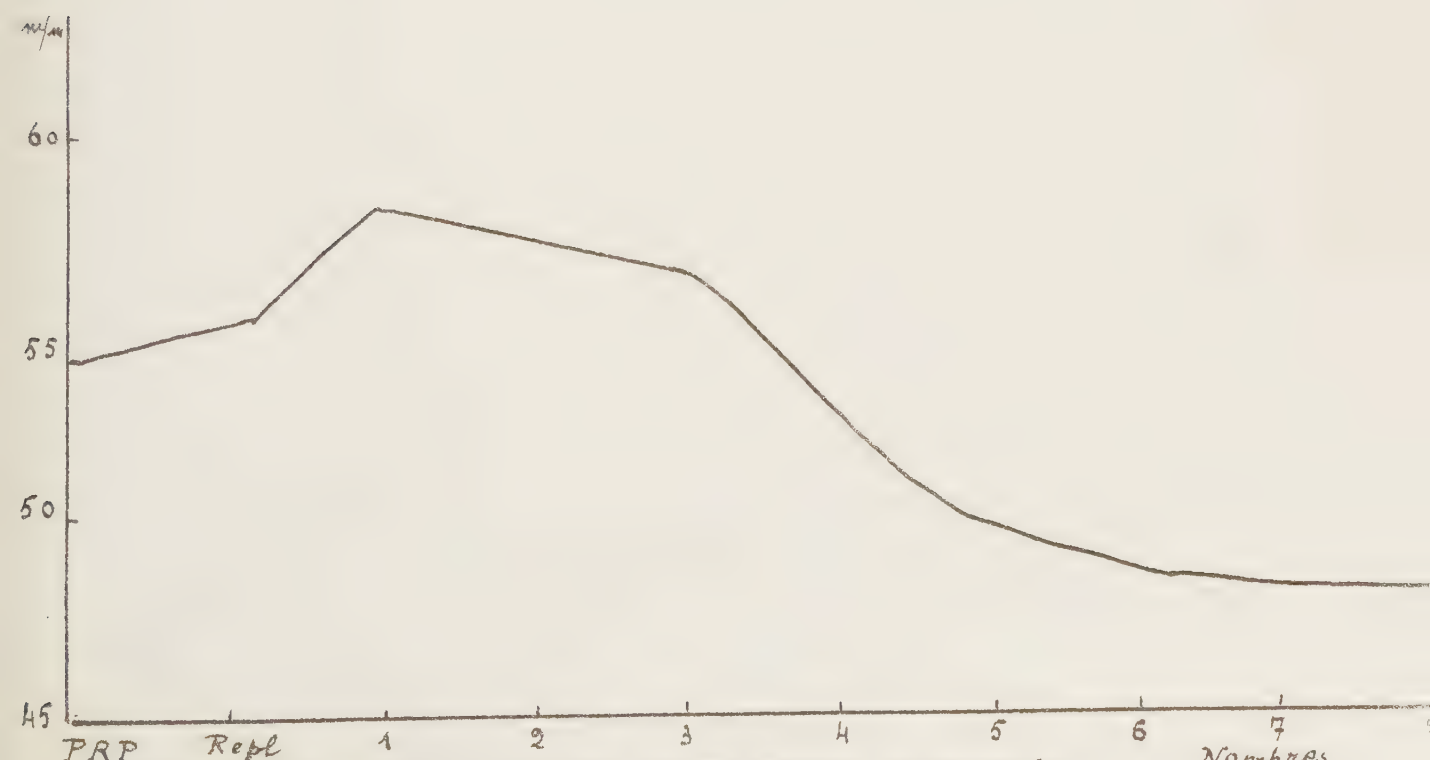


Fig. XXI : Variations de la constante Am_1 en fonction du nombre de lavages.

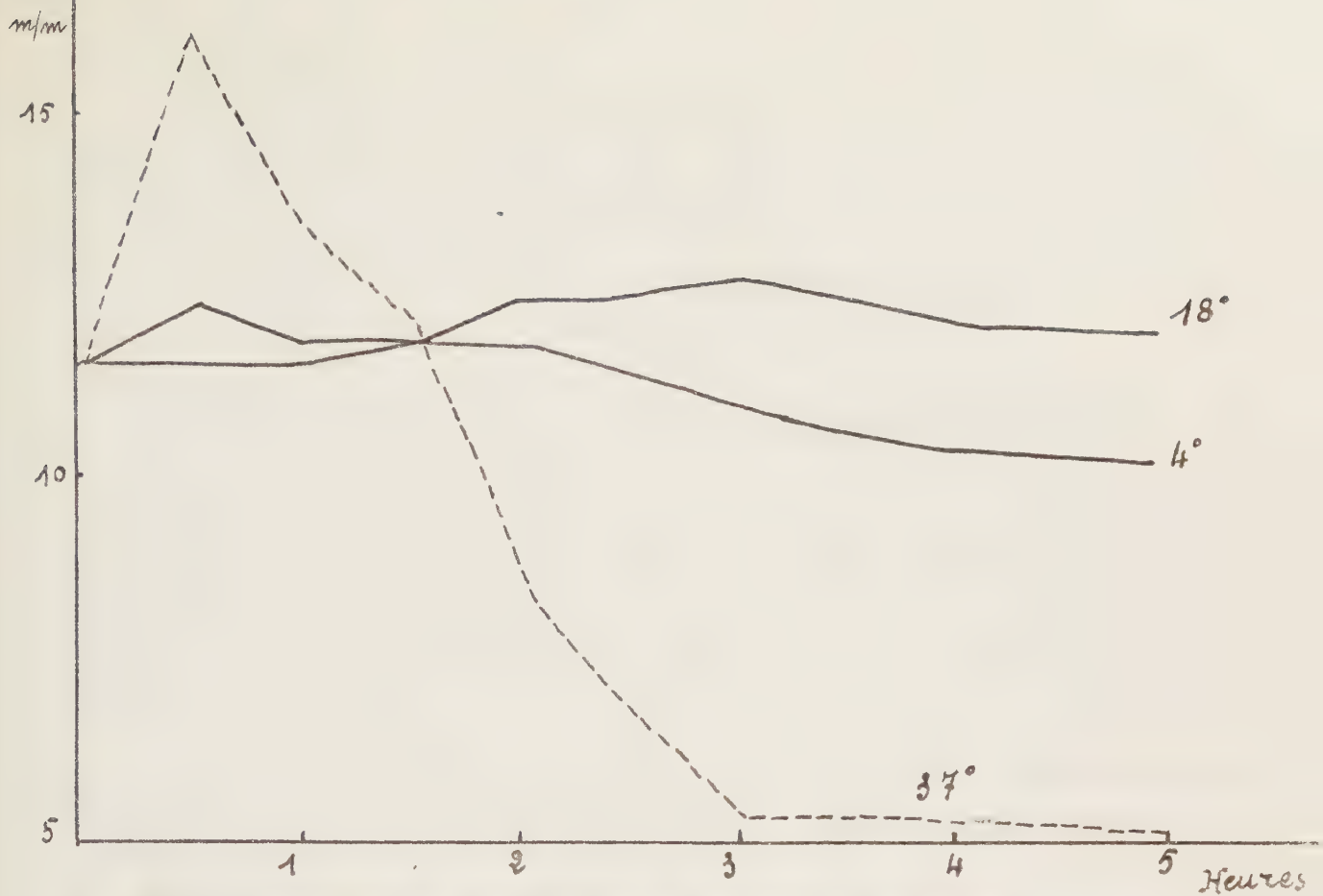


Fig. XXII : Variations de r en fonction de la durée d'incubation.

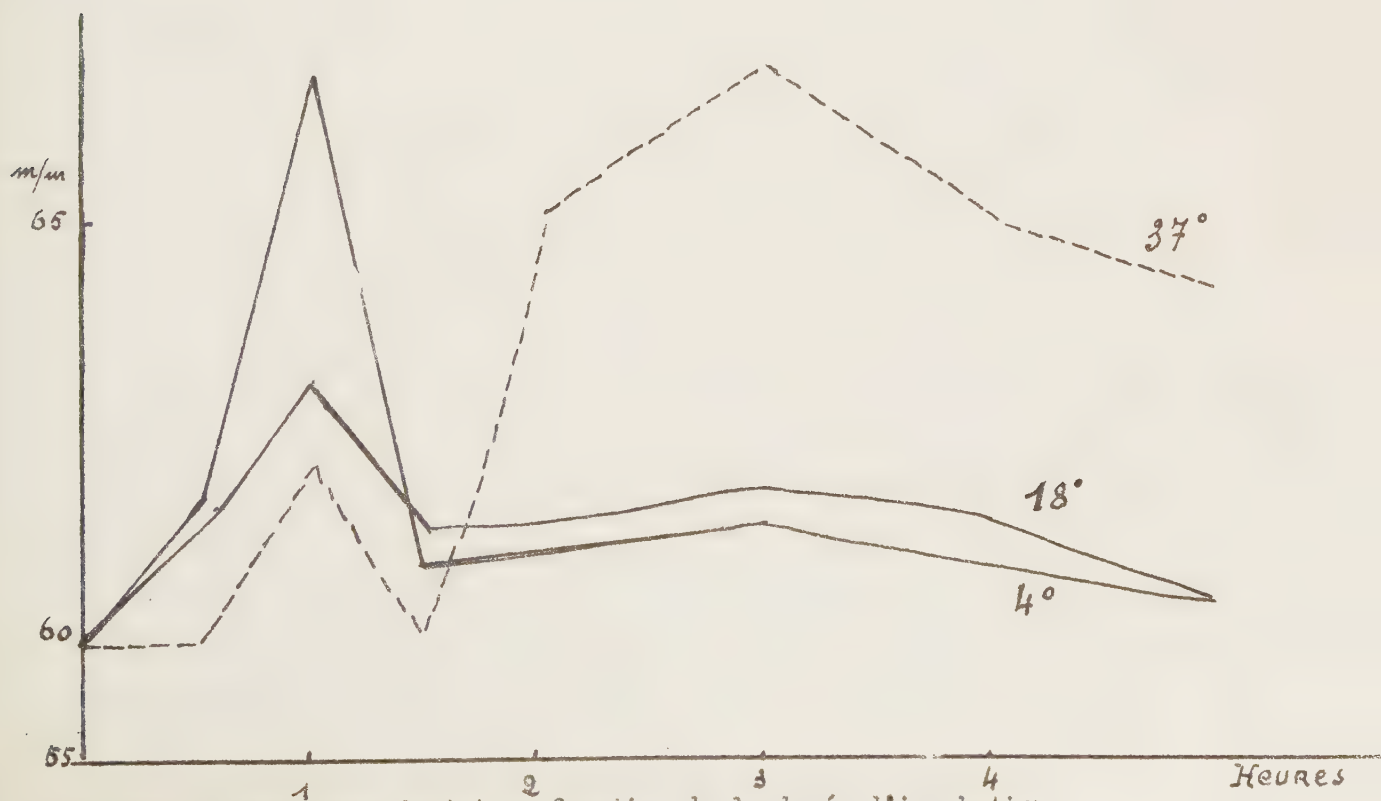


Fig. XXIII : Variations de AmI en fonction de la durée d'incubation.

- CONCLUSION -

. Eventuellement, une incubation des plaquettes est possible pendant une demi-heure à 18° ou à 37°. De cette façon on n'observe pas de modification de la constante Am_1 et seulement un léger allongement de r à 37°.

. D'autre part, contrairement à ce que l'on pensait, les plaquettes se conservent pendant quatre heures aussi bien à 18° qu'à 4°.

b) Incubation des plaquettes dans différentes fractions protéiques :

Nous avons fait ces expériences parce qu'en pathologie, notamment dans les thromboses on observe une augmentation de l'amplitude maxima des diagrammes thrombodynamographiques paraissant liée à un syndrome protéique d'inflammation. Nous avons donc essayé d'identifier une protéine qui agirait sur les fonctions des plaquettes (de la même façon nous décrirons l'action de ces mêmes protéines sur l'amplitude du PDP).

D'autre part, Sokal (95) a trouvé que la sérum-albumine influence l'amplitude maxima et la rétraction du caillot (donc la fonction thrombodynamique des plaquettes).

TECHNIQUE -

Les plaquettes séparées comme précédemment ont été incubées dans différentes substances :

- fraction II (contenant 90 % de γ globulines)
- fraction V (contenant 90 % de sérum albumine)
- céruloplasmine
- haptoglobine
- complexe haptoglobine-hémoglobine.

Les fractions II et V du plasma humain sont préparées selon la technique de Cohn modifiée par Nitschmann au Centre National de Transfusion Sanguine.

La céruloplasmine utilisée est le produit préparé par la technique décrite par M. Steinbuch (99).

Nous avons utilisé deux lots d'haptoglobine, l'un provenant du Centre National de Transfusion sanguine et préparé selon la technique de M. Steinbuch (100), l'autre mis en expérience sous forme de complexe haptoglobine-hémoglobine nous a

été fourni par le Laboratoire du Professeur Jayle de la Faculté de Médecine de Paris où il est préparé selon la technique de Smith, Edman et Owen (93).

Nous avons mis ces fractions protéiques en solution en tampon véronal-acétate de façon à réaliser dans nos expériences des concentrations de protéine active allant de une à dix fois la concentration physiologique.

Les plaquettes sont incubées dans ces différentes fractions pendant $\frac{1}{2}$ heure à 37° ou à 18°. Puis elles sont lavées en tampon véronal-acétate et finalement remises en suspension en concentration normale dans un PDP citraté provenant du même individu.

Nous enregistrons alors un diagramme et comme contrôle nous faisons toujours un diagramme

- du PRP
- du PDP
- du PDP replaqueté avec des plaquettes non incubées
- du PDP replaqueté avec des plaquettes incubées en tampon.

Pour chaque protéine étudiée nous avons fait quinze expériences en utilisant plusieurs concentrations.

RESULTATS -

La fraction II (γ globulines), la fraction V (sérum-albumine), l'haptoglobine, le complexe haptoglobine-hémoglobine ne provoquent aucune modification des constantes par rapport à un témoin. Aucune de ces protéines ne modifie donc la fonction thrombodynamique des plaquettes ni d'ailleurs leur fonction thromboplastique.

Par contre, dans les mêmes conditions d'étude, la céruloplasmine provoque des modifications plaquettaires très nettes (Fig. XXIV) :

- Raccourcissement de r et k plus marqué si l'incubation est pratiquée à 37°.
- importante diminution de l'amplitude maxima pouvant atteindre 10 et même 20 mm.

Ces modifications se retrouvent de façon constante dans les quinze expériences.

Les plaquettes observées au microscope en contraste de phase présentent des altérations morphologiques : la plupart d'entre elles ont un aspect en fuseau avec de grands filaments de fibrine ; d'autres sont agrégées par paquets et présentent l'aspect dit de métamorphose visqueuse.

- CONCLUSION -

Ni les γ globulines , ni l'haptoglobine, ni le complexe haptoglobine-hémoglobine n'influencent la fonction thrombodynamique des plaquettes.

De la même façon dans nos expériences la sérum-albumine sous forme de fraction V purifiée du plasma humain s'est révélée inerte. Nous ne confirmons donc pas les résultats antérieurs de Sokal. La fraction V utilisée par cet auteur comportait peut-être une impureté responsable des effets qu'il a décrits.

Enfin, la céruloplasmine se comporte comme un activateur, à savoir le raccourcissement des constantes de thromboplastine et la diminution de l'amplitude maxima ne peuvent en effet que correspondre à une activation et à une métamorphose visqueuse des plaquettes pendant l'incubation ; ces plaquettes étant alors devenues fonctionnellement indisponibles quand on enregistre les diagrammes. L'examen en contraste de phase le confirme.

La céruloplasmine que nous avons étudiée était hautement purifiée, il est donc improbable que les modifications observées soient dues à une impureté.

Par contre, nous ne savons pas si la céruloplasmine intervient dans les mêmes conditions en pathologie.



Fig. XXIV

- 1 = PRP
- 2 = PDP replaquetté avec des plaquettes incubées
en tampon
- 3 = PDP replaquetté avec des plaquettes incubées
dans solution de céruloplasmine

C H A P I T R E V I I

* * *

ETUDE DE L'EFFET DE L'ACTIVATION DU FACTEUR XII (f.Hageman)
SUR L'ACTIVITE THROMBODYNAMIQUE DES PLAQUETTES

Le rôle des plaquettes dans la phase initiale de la thromboplastinoformation et l'effet du contact dans l'activation des plaquettes ont déjà été étudiés par plusieurs auteurs (79 - 80 - 85 - 89).

Pour Quick (82) un constituant plasmatique, le "facteur contact" ou facteur Hageman est activé au contact du verre et réagit avec les plaquettes pour donner naissance à une activité prothromboplastique néoformée semblable à celle existant dans les érythrocytes et appelée érythrocytine. Ce dernier facteur entrerait ensuite en réaction avec les facteurs VIII et IX pour former la thromboplastine.

Pour Caen (14) les plaquettes incubées dans du plasma dit "contact" adsorbent le facteur contact et sont activées c'est-à-dire qu'elles libèrent des facteurs plaquettaires actifs dans la coagulation du sang.

Pour J. Jürgens (43 - 44) l'activation du facteur XII périplaquettaire au contact d'une surface mouillable détermine la désintégration des plaquettes.

Nous avons voulu vérifier ces faits et rechercher en quoi ils modifient l'activité thrombodynamique des plaquettes. Puisqu'il est bien démontré que parmi les facteurs de l'atmosphère plasmatique périplaquettaire il y a du facteur XII, nous nous sommes proposé de provoquer une activation indirecte des plaquettes en leur faisant adsorber du facteur XII plasmatique activé.

TECHNIQUE -

1°- Préparation des réactifs

.PPlasma intact

Le sang est prélevé sur citrate dans les conditions habituelles des prélèvements pour les examens thrombodynamographiques. On centrifuge à 4.500 tours/minute (2750 g) pendant 30 minutes à 4° C en matériel siliconé. Le PDP ainsi obtenu est dit "plasma intact" : dans un tel plasma le facteur XII est peu ou pas activé.

.Plasma contact

Une partie de ce PDP intact est transformé en plasma contact par agitation pendant 20 minutes en présence de ballottinies de verre. Dans un plasma ainsi traité le facteur XII est activé en très grande proportion.

.Plaquettes

Les plaquettes homologues de ces plasmas sont séparées comme nous l'avons décrit précédemment à partir d'un plasma intact provenant de sang prélevé sur EDTA en matériel siliconé : on sépare ainsi les plaquettes "intactes".

2°- Incubation des plaquettes

Les plaquettes sont incubées à 18° C ou à 37° C pendant 30 minutes en matériel siliconé soit dans du PDP intact soit dans du PDP contact.

Après incubation, les suspensions plaquettaires sont recentrifugées et les plaquettes lavées en tampon véronal acétate à pH 7,35. Enfin elles sont remises en suspension soit dans du PDP intact soit dans du PDP contact.

Ainsi disposons-nous de quatre types de préparations :

- plaquettes "intactes" en suspension dans du PDP "intact"
- plaquettes "contact" en suspension dans du PDP "intact"
- plaquettes "intactes" en suspension dans du PDP "contact"
- plaquettes "contact" en suspension dans du PDP "contact"

En outre, comme témoin nous préparons des plaquettes "intactes" incubées en tampon véronal-acétate et remises en suspension soit dans du PDP intact soit dans du PDP contact.

Des diagrammes de ces différentes préparations sont enregistrés, et à titre de contrôle nous enregistrons encore :

- le PRP initial (plasma intact - plaquettes intactes)
- le PDP(intact)
- le PDP intact replaqueté avec les plaquettes non incubées (plasma intact - plaquettes intactes).

Douze expériences ont été faites avec chacune des préparations.

RESULTATS -

1°- Plaquettes intactes incubées en tampon et remises en suspension en PDP intact ou contact -

Lorsque les plaquettes intactes sont incubées en solution tampon et remises en suspension en PDP contact, on observe seulement sur les diagrammes un très léger raccourcissement de r et k (1 à 2 mm) par rapport aux diagrammes enregistrés avec des plaquettes incubées dans les mêmes conditions mais remises en PDP intact.

Par contre, la constante $Am1$ ne présente aucune modification (Fig. XXV, XXVI).

Ceci prouve que, dans ce cas, les plaquettes n'ont pas subi de modifications et qu'elles ne sont pas en cause. Le léger raccourcissement de r et k est simplement dû au fait que le facteur XII est activé dans le plasma contact.

2°- Plaquettes intactes incubées en PDP intact et remises en suspension en PDP intact -

Lorsque les plaquettes intactes sont incubées en PDP intact puis remises en suspension en PDP intact on observe un raccourcissement modéré de r et k par rapport aux diagrammes obtenus avec les plaquettes incubées en solution tampon. L'amplitude maxima est elle aussi diminuée de façon modérée (Fig. XXVII).

r	Variations	moyenne	4 mm
		extrêmes	2 à 6 mm
k	Variations	moyenne	5 mm
		extrêmes	2 à 9 mm
$Am1$	Variations	moyenne	5 mm
		extrêmes	2 à 10 mm

La seule raison des différences observées par rapport aux diagrammes obtenus avec des plaquettes incubées en tampon vient de l'incubation des plaquettes dans du PDP intact : ces modifications sont donc très probablement dues à la présence dans ce plasma d'une petite quantité de facteur XII activé, qui est adsorbé par les plaquettes pendant leur incubation.

3°- Plaquettes intactes incubées en PDP intact et remises en suspension en PDP contact -

Lorsque les plaquettes intactes **sont** incubées en PDP intact puis remises en suspension en PDP contact on observe un raccourcissement des constantes r et k assez net par rapport aux diagrammes obtenus avec des plaquettes intactes incubées en tampon et remises en PDP contact.

Quant à l'amplitude maxima elle est diminuée mais ici encore de façon modérée.

r	Variations	moyenne	6 mm
		extrêmes	3 à 9 mm
k	Variations	moyenne	7 mm
		extrêmes	3 à 11 mm
Aml	Variations	moyenne	7 mm
		extrêmes	3 à 11 mm

L'incubation des plaquettes dans du PDP intact provoque donc des modifications de leurs propriétés thromboplastiques et thrombodynamiques.

Ceci est très probablement dû comme nous l'avons dit précédemment à la présence dans ce plasma d'une petite quantité de facteur XII activé.

4°- Plaquettes contact remises en suspension en PDP intact -

Lorsque les plaquettes intactes sont incubées en PDP contact elles adsorbent le facteur XII plasmatique activé et se transforment en plaquettes "contact".

Lorsqu'elles sont ensuite remises en suspension en PDP intact on observe un raccourcissement net de r et k et une diminution de l'amplitude maxima importante (Fig. XXVIII)

r	Variations	moyenne	8 mm
		extrêmes	2 à 10 mm
k	Variations	moyenne	8 mm
		extrêmes	2 à 12 mm
Aml	Variations	moyenne	12 mm
		extrêmes	7 à 20 mm

La différence avec les expériences précédentes étant qu'ici les plaquettes ont été incubées en plasma contact les modifications des diagrammes ne peuvent provenir que de cette incubation.

5°- Plaquettes contact remises en suspension en PDP contact -

Lorsque les plaquettes intactes incubées en PDP contact sont remises en suspension en PDP contact on note un important raccourcissement de r et k qui dans la majorité des expériences diminuent de la moitié de leur valeur.

La diminution de l'amplitude maxima est toujours importante atteignant 20 mm dans la moitié des cas.

r	Variations	moyenne	9 mm
		extrêmes	3 à 12 mm
k	Variations	moyenne	10 mm
		extrêmes	3 à 13
Aml	Variations	moyenne	13 mm
		extrêmes	5 à 22 mm

Dans ces deux derniers types d'expériences on note aussi des modifications des constantes de rétraction : les diagrammes montrant une tendance à l'hyporétractilité.

DISCUSSION --

Au total les plaquettes incubées dans un PDP où le facteur XII est activé subissent des modifications telles que lorsqu'on les remet en suspension dans du PDP dont le facteur XII est activé ou non activé il se produit :

- Un raccourcissement de r et k (c'est-à-dire une augmentation de l'activité thromboplastique).

- Une diminution de l'amplitude maxima (c'est-à-dire une diminution de l'activité thrombodynamique)

par rapport à ce qui se passe dans un PDP dont le facteur XII est activé ou non activé et qui est replaqueté avec des plaquettes intactes.

Le phénomène se passe bien au niveau des plaquettes pendant leur incubation dans le PDP contact ainsi que le prouvent les résultats des expériences rapportées aux paragraphes 4 et 5. Les résultats identiques observés dans ces deux types d'expérience prouvent que le facteur XII plasmatique activé est adsorbé par les plaquettes et agit sur elles.

Nous retrouvons le même type de modifications que celles provoquées par l'incubation des plaquettes dans la céruloplasmine.

- CONCLUSION -

Lors de l'enregistrement des diagrammes de coagulation des mélanges de plaquettes contact avec un PDP substrat intact ou contact, ces plaquettes activées par le facteur contact manifestent une activité prothromboplastique beaucoup plus grande que les plaquettes témoin non activées (plaquettes intactes).

Par contre elles sont devenues partiellement indisponibles pour la structuration et la rétraction du caillot. Elles ont donc subi dès leur activation par le facteur contact cette modification fonctionnelle irréversible qui, dans la définition de Lusher (60) et Bounameaux (7 - 8), s'appelle la métamorphose visqueuse.

L'aspect des plaquettes au microscope en contraste de phase avant et après incubation confirme le fait.

Nos expériences démontrent aussi que la fonction thrombodynamique des plaquettes s'exerce par l'intermédiaire de la métamorphose visqueuse.

En effet quand les plaquettes ont subi cette modification elles sont devenues indisponibles pour la structuration du caillot.

La thrombodynamographie vérifie bien que le facteur XII activé (facteur contact) détermine ou contribue à déterminer la métamorphose visqueuse des plaquettes.

Ceci explique les artéfacts d'enregistrement observés quand on prélève le sang en matériel ordinaire.

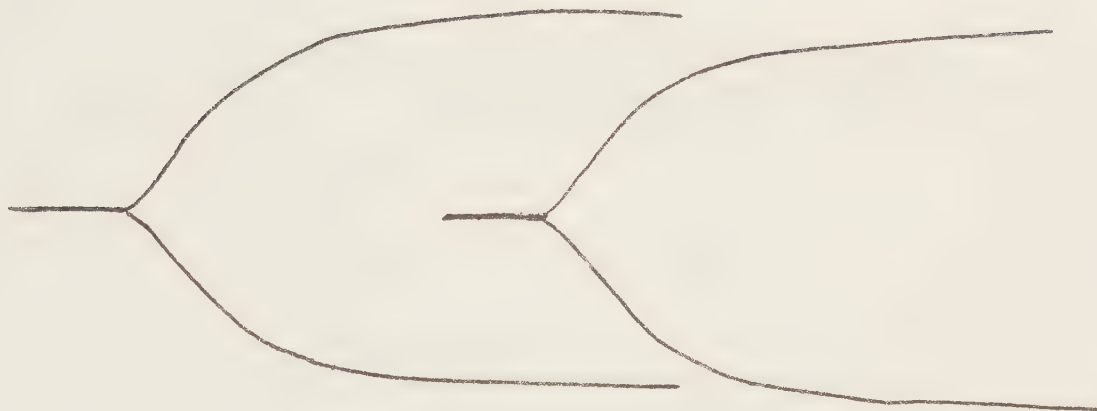


Fig. XXV : PRP initial et PDP replaqueté

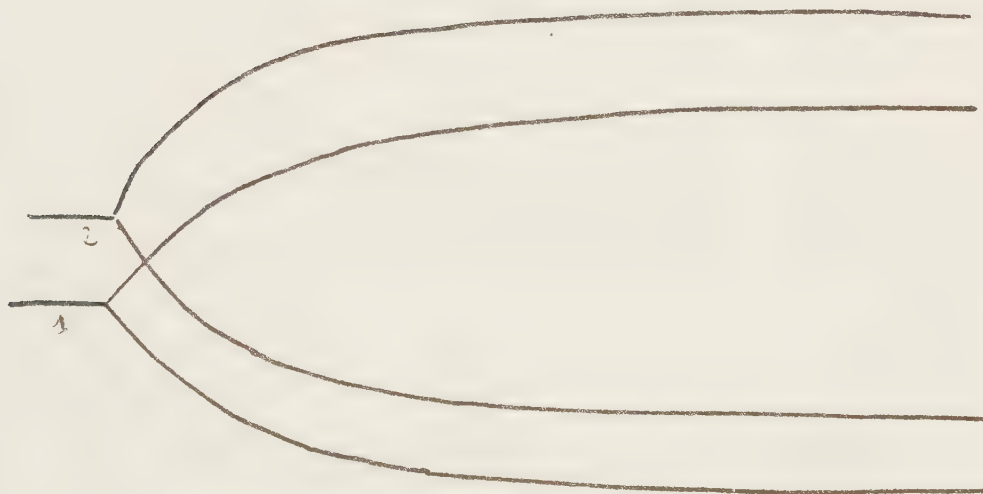


Fig. XXVI : PDP 1 intact
2 contact

replaquetés avec des plaquettes incubées en tampon

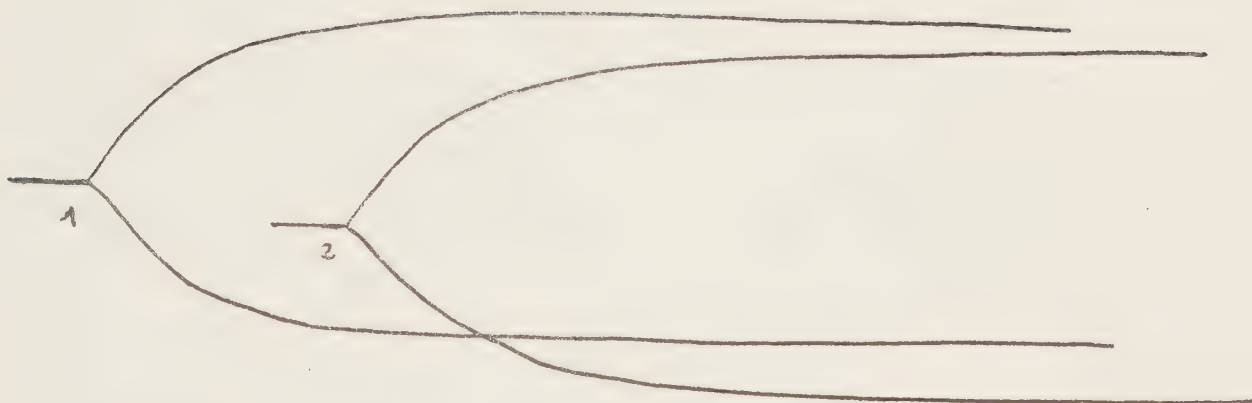


Fig. XXVII : PDP 1 intact
 2 contact

replaquettés avec des plaquettes incubées en PDP intact



Fig. XXVIII : PDP 1 intact
 2 contact

replaquettés avec des plaquettes incubées en PDP contact

C H A P I T R E VIII

* * *

ACTION DES PLAQUETTES SUR LA LYE DU CAILLOT DES EUGLOBULINES

=====

Il est démontré maintenant que les plaquettes interviennent dans la fibrinolyse par au moins deux facteurs antagonistes :

- une antiplasmine
- un pro-activateur du plasminogène

L'existence d'une anti-plasmine plaquettaire démontrée par Johnson et Schneider (41) a été retrouvée par Stéfanini et Murphy (98) et Gross et Holemans (32-39)

Johnson et Schneider ont en effet titré l'activité antiplasmine comparée du PRP, du PDP, des plaquettes et du sérum. Le PDP et le sérum n'ont que 30% de l'activité présente dans le PRP tandis que 70% de cette activité du PRP se **retrouve** dans les plaquettes isolées.

Stéfanini et Murphy ont confirmé ces résultats.

Pour Gross et Holemans il s'agit d'un facteur plaquettaire vrai dont la localisation est intra-plaquettaire. En effet dans leurs expériences les plaquettes lysées ont la même activité que les plaquettes intactes.

L'existence d'un proactivateur plaquettaire du plasminogène envisagée par Bierstedt (1) a été récemment mise en évidence par Gross et Holemans (39). Pour ces auteurs il s'agirait d'un facteur adsorbé sur les plaquettes puisqu'il est détruit par plusieurs lavages ou par un chauffage à 70°.

Cette double activité plaquettaire a été confirmée aussi par Reid, Somlyo et Custer (86).

Ces deux activités antagonistes expliqueraient que selon les auteurs et les conditions d'expérience les plaquettes activent ou inhibent la fibrinolyse.

S'il y a des contradictions entre les différents auteurs qui ont étudié le rôle des plaquettes dans la fibrinolyse il est bien certain en tout cas que, dans les fibrinolyse pathologiques étudiées au thrombodynamogramme la lyse est toujours plus rapide sur les diagrammes de PDP que sur ceux de PRP. Nous avons même vu dans le laboratoire du Professeur M. E. Leroux un cas de fibrinolyse chez un malade atteint de cancer de la prostate avec métastases osseuses, où dans un temps la fibrinolyse n'était enregistrée que sur les diagrammes de PDP, le diagramme de PRP restant normal pendant plus de huit jours avant de prendre à son tour l'aspect caractéristique en fuseau.

Il nous a donc paru intéressant de reprendre cette étude sur le rôle des plaquettes dans la fibrinolyse. Nous avons recherché l'action de suspensions plaquettaires sur la lyse du caillot des euglobulines dans les tests du type von Kaulla et dans des expériences thrombo-dynamographiques.

Etant donné que le facteur XII est un activateur de la fibrinolyse ainsi que l'ont montré Niewiarowski et Prou-Wartelle (75) (les plasmas d'oiseaux dépourvus de facteur XII ont un système plasminogène - plasmine inerte et les sujets atteints du trait Hagaman ont un système fibrinolytique inactivable) et étant donné aussi que les expériences rapportées au chapitre précédent prouvent que l'activation du facteur XII interfère sur l'activité des plaquettes il nous a paru que le facteur XII intact ou activé est un paramètre fondamental de telles expériences. C'est pourquoi nous en avons tenu le plus grand compte.

TECHNIQUE -

a) Préparation des euglobulines.

Nous les avons préparées dans deux conditions :

- à partir d'un plasma intact : toutes les opérations se font en matériel siliconé. Le PRP recueilli en matériel siliconé est centrifugé à 4.500 tours/mi-nute. A partir du PDP intact on précipite les euglobulines par dilution du plasma dans l'eau distillée et acidification par l'anhydride carbonique comme nous l'avons dit au chapitre II en décrivant la technique classique de von Kaulla.

Le culot des euglobulines est ensuite remis en solution dans 1 milli-litre de tampon véronal-acétate à pH 7,35. On obtient une solution d'euglobulines non activées par le facteur XII (euglobulines intactes).

- à partir d'un plasma contact : la technique de préparation est identique mais tout se fait en matériel ordinaire non siliconé, en partant d'un PDP contact: on obtient des euglobulines "contact".

b) Nous avons réglé un test de lyse du caillot des euglobulines en thrombo-dynamographie :

On introduit dans la cuve de l'appareil 0,25 ml de la solution d'euglobulines puis on ajoute :

- soit 0,10 ml d'une solution de Cl_2Ca à la concentration utilisée habituellement en thrombodynamographie ;

- soit 0,10 ml d'une solution de thrombine au 1/100 (une ampoule de thrombase Roussel et diluée dans 5 ml d'eau physiologique puis cette solution est rediluée au 1/100).

Les diagrammes enregistrés montrent une image typique de fibrinolyse (image en fuseau) mais leur amplitude maxima est toujours très petite variant entre 5 et 8 mm puisqu'on utilise non pas le PDP lui-même mais seulement les euglobulines du PDP.

Cette amplitude maxima des diagrammes est à peu près identique, que l'on utilise le Cl_2Ca ou la thrombine pour coaguler les euglobulines.

La lyse est cependant généralement un peu plus rapide en présence de calcium (1/2 à 1 heure de moins).

Ainsi nous avons :

<u>en présence de Ca</u>	<u>en présence de thrombine</u>
2 H	2 H 30
2 H	2 H 45
4 H	5 H

On peut même obtenir une image en fuseau sans ajouter de Cl_2Ca ou de thrombine aux euglobulines qui coagulent spontanément.

Des essais ont été faits chez 50 sujets normaux en utilisant des euglobulines intactes. Dans la moitié des cas nous avons comparé l'action de la thrombine à celle du calcium, dans l'autre moitié des cas nous n'avons utilisé que le calcium.

Nous avons obtenu des temps de lyse compris entre 2 et 5 heures (la longueur du fuseau de lyse varie de 20 à 55 cm).

Des tests en tubes selon la méthode de von Kaulla ont été faits parallèlement. On utilise des tubes siliconés ou non siliconés selon que les euglobulines sont intactes ou "contact".

Les temps de lyse obtenus par cette méthode sont toujours un peu plus longs (45 minutes à 3 heures de plus) que ceux obtenus en thrombodynamographie.

Par exemple :

<u>en tube</u>	<u>en thrombodynamographie</u>
6 h. 30	5 h.
6 h.	5 h.
3 h. 30	2 h.
6 h.	3 h.
7 h.	4 h.

Si les euglobulines proviennent d'un plasma contact la lyse est toujours plus rapide (1/2 h à 1 h. de moins) que le test soit effectué en tube ou au thrombodynamogramme. Les résultats normaux obtenus en tube coïncident alors avec les chiffres normaux donnés par von Kaulla.

c) Préparation des suspensions plaquettaires : elles sont préparées comme nous l'avons dit au chapitre précédent en vue d'obtenir des plaquettes intactes et des plaquettes "contact"

d) Adjonction de plaquettes en quantité progressivement croissantes à la solution d'euglobulines : les suspensions plaquettaires sont ajoutées aux euglobulines avant la recalcification (nous n'avons utilisé ici que la coagulation des euglobulines par le calcium, cette technique est préférable en présence de plaquettes).

Les plaquettes étant ^{intactes}
ou "contact"

et les solutions d'euglobulines étant elles-mêmes

^{intactes}
ou "contact"

nous avons donc six types de préparations :

- euglobulines intactes - plaquettes intactes non incubées
- euglobulines intactes - plaquettes intactes incubées
- euglobulines intactes - plaquettes "contact"
- euglobulines "contact" - plaquettes intactes non incubées
- euglobulines "contact" - plaquettes intactes incubées
- euglobulines "contact" - plaquettes "contact"

On enregistre toujours comparativement un témoin avec une solution d'euglobulines intactes ou "contact" sans plaquettes.

RESULTATS -

1°- Différence de vitesse de lyse entre les euglobulines intactes et "contact".

La **lyse** plus rapide du caillot des euglobulines "contact" par rapport à celui des euglobulines intactes confirme que le facteur XII activé se comporte comme un activateur de la transformation du plasminogène en plasmine.

2°- Lyse des euglobulines intactes en présence de plaquettes.

Avec des plaquettes intactes non incubées :

L'adjonction de plaquettes intactes à la solution d'euglobulines provoque une augmentation de l'amplitude maxima des diagrammes obtenus proportionnelle à la quantité de plaquettes ajoutées. Avec des concentrations plaquettaires normales les amplitudes obtenues sont voisines de celles d'un PRP normal.

L'adjonction de plaquettes intactes en quantité croissante dans les solutions d'euglobulines intactes détermine aussi un retard progressif de la lyse spontanée de leur caillot.

Nous avons fait dix expériences de ce type qui ont toutes donné des résultats concordants.

En moyenne, pour des concentrations plaquettaires voisines de 50.000 par mm^3 , le temps de lyse atteint 8 heures (variations extrêmes 6 h - 9 h) tandis que pour des concentrations de 100.000/ mm^3 il est voisin de 10 h. (variations extrêmes 8 h. - 12 h.) et supérieur à 15 h. atteignant même quelquefois 24 h. lorsque la concentration plaquettaire est normale.

Les résultats des tests en tube sont parallèles.

Résultat fondamental : pour des plaquettes intactes données et des euglobulines intactes données, le retard de lyse induit par les plaquettes, d'autant plus important que leur nombre est plus grand, est également d'autant plus important qu'elles ont davantage augmenté l'amplitude maxima du diagramme, c'est-à-dire que leur activité thrombodynamique est plus grande.

Aux faibles concentrations, les plaquettes activaient la lyse des euglobulines dans les expériences de Caen (13). Remarquons que cet auteur opère en tube et introduit des plaquettes dans le PDP avant d'en extraire les euglobulines. Il doit donc altérer une grande quantité de plaquettes lors de cette préparation.

Nos expériences démontrent que les plaquettes intactes se comportent comme des inhibiteurs de la lyse du caillot des euglobulines et ceci d'autant plus qu'elles sont en plus grand nombre.

N.B. - Nous n'avons pu illustrer ce chapitre par des diagrammes en raison de leurs dimensions.

Avec des plaquettes intactes incubées en PDP intact :

Dans nos dix expériences la lyse est ici un peu plus rapide (1/2 h. à 1 h. de moins) c'est-à-dire que pour des concentrations plaquettaires normales le temps de lyse varie entre 13 h. et 15 h.

Notons que nous avons vu dans le chapitre précédent que les plaquettes incubées en plasma intact ont perdu une partie de leur activité thrombodynamique.

Avec des plaquettes "contact" :

Nous avons réalisé dix expériences de ce type. Dans tous les cas les plaquettes "contact" augmentent l'amplitude maxima des diagrammes et retardent la lyse des euglobulines proportionnellement à leur nombre. Dans cinq expériences elles s'avèrent aussi actives que les plaquettes intactes aussi bien sur l'amplitude maxima que sur l'inhibition de la lyse. Dans cinq autres expériences elles ont perdu une notable partie de leur activité thrombodynamique et antilytique par rapport aux plaquettes intactes.

En moyenne la lyse du caillot des euglobulines qui, sans plaquettes se produit entre 2 et 5 h., est alors retardée jusqu'à 8 - 10 h. tandis qu'elle ne se produit pas avant 15 h. quand des plaquettes intactes sont présentes.

En résumé, les plaquettes "contact" ont encore une notable activité inhibitrice de la lyse du caillot des euglobulines mais moins cependant que les plaquettes intactes.

La seule variable par rapport à l'expérience précédente étant l'incubation des plaquettes dans un PDP dont le facteur XII est activé, ce ne peut être que l'activation de ce facteur XII qui diminue l'effet antifibrinolytique des plaquettes. En effet, nous avons vu précédemment que ce facteur XII activé active un certain nombre de plaquettes qui entrent en métamorphose visqueuse, devenant alors, dans les expériences, indisponibles pour structurer le caillot. La perte relative d'activité antifibrinolytique des plaquettes préalablement activées par le facteur "contact" apparaît donc liée à une perte correspondante de leur activité thrombodynamique.

En résumé, les plaquettes intactes non incubées allongent le temps de lyse de 3 à 10 fois,

les plaquettes intactes incubées en PDP intact allongent le temps de lyse de 3 à 6 fois

les plaquettes "contact" allongent le temps de lyse de 2 à 4 fois.

Avec des plaquettes lysées :

Nous avons réalisé dix essais en introduisant des concentrations croissantes de lysat de plaquettes dans des euglobulines intactes.

Les plaquettes sont lysées par broyage suivi de plusieurs congélations-décongélation brutales. On les met en suspension dans les mêmes conditions de volume que les suspensions de plaquettes entières. On vérifie que ces suspensions ne modifient plus l'amplitude maxima des PDP normaux.

Les diagrammes de coagulation des euglobulines en présence de lysats de plaquettes ont l'amplitude maxima de 5 à 8 mm habituelle en dehors de la présence de plaquettes entières.

L'effet des plaquettes lysées sur le temps de lyse s'avère variable d'une expérience à l'autre mais on ne note jamais un retard important comparable à celui qui est de règle quand des plaquettes thrombodynamiques prennent part à la réaction.

3°- Lyse des euglobulines "contact" en présence de plaquettes :

Avec des plaquettes intactes non incubées

Dix essais nous ont donné des résultats concordants.

L'adjonction de plaquettes intactes provoque une augmentation de l'amplitude maxima des diagrammes, proportionnelle à la quantité de plaquettes ajoutées. Cependant cette amplitude est toujours un peu moins élevée que celle obtenue quand on utilise des solutions d'euglobulines intactes.

L'adjonction de plaquettes intactes détermine un retard progressif de la lyse spontanée du caillot des euglobulines **par rapport** au témoin, d'euglobulines "contact" sans plaquettes.

Le temps de lyse est allongé dans les mêmes proportions (de 3 à 10 fois) que dans les expériences faites avec des euglobulines intactes. Mais évidemment ces temps de lyse sont, dans l'ensemble, plus courts que dans les expériences précédentes puisque de toute façon la lyse des euglobulines "contact" est plus rapide.

Ces expériences montrent que les plaquettes thrombodynamiques se comportent encore comme de puissants inhibiteurs de la fibrinolyse même quand un activateur de ce système, le facteur XII activé, intervient dans l'activation du plasminogène.

Avec des plaquettes intactes incubées en PDP intact :

Dans nos dix expériences l'adjonction de plaquettes incubées en PDP intact augmente l'amplitude maxima des diagrammes et retarde la lyse des euglobulines.

Mais dans la moitié des expériences seulement elles s'avèrent aussi actives que les plaquettes intactes non incubées. Dans les autres cas elles ont perdu une partie de leur activité thrombodynamique et antilytique.

Les plaquettes intactes incubées allongent le temps de lyse de 3 à 6 fois par rapport au témoin d'euglobulines "contact" (la lyse étant au total toujours un peu plus rapide que dans les expériences utilisant des euglobulines intactes).

Rappelons que, dans le chapitre précédent, nous avons noté que les plaquettes incubées en PDP intact ont perdu une partie de leur activité thrombodynamique.

Avec des plaquettes "contact" :

Dans nos dix essais les plaquettes "contact" augmentent encore l'amplitude maxima des diagrammes mais beaucoup moins que dans les cas précédents.

D'autre part, elles retardent toujours les temps de lyse spontanée du caillot d'euglobulines, mais les temps de lyse observés sont toujours les plus courts : 6 à 8 heures (elles allongent le temps de lyse de 2 à 4 fois).

Elles ne s'avèrent donc jamais aussi actives que des plaquettes intactes.

Cette perte d'activité est due, là encore, à leur incubation en PDP contact.

Avec des plaquettes lysées

Les diagrammes obtenus ont toujours une amplitude minime et on ne note pas de retard du temps de lyse par rapport au témoin euglobulines "contact" comme il est de règle lorsque des plaquettes thrombodynamiques prennent part à la réaction.

De toute façon avec ou sans plaquettes la lyse du caillot des euglobulines "contact" est toujours plus rapide que celle des euglobulines intactes, mais les plaquettes allongent les temps de lyse dans les mêmes proportions que dans les expériences utilisant des euglobulines intactes. Elles protègent donc de toute façon le caillot de la lyse.

- CONCLUSIONS -

Les expériences précédentes démontrent que les plaquettes thrombodynamiques retardent la lyse spontanée du caillot des euglobulines proportionnellement à leur nombre et à leur activité thrombodynamique.

A la fonction thrombodynamique on avait déjà rattaché la structuration et la rétraction du caillot. Nous pouvons donc lui rattacher aussi une intense activité protectrice du caillot contre la lyse par la plasmine.

L'état d'activation du facteur XII apparaît fondamental dans cette activité antifibrinolytique globale des plaquettes thrombodynamiques. En effet, une activation prématurée du Facteur XII consomme un certain nombre de ces plaquettes qui subissent une métamorphose visqueuse et sont dès lors indisponibles pour des activités thrombodynamiques ultérieures. D'autre part le facteur XII activé se comporte comme un activateur de la lyse des euglobulines. Au total l'activation prématurée du facteur XII est un phénomène antagoniste de l'activité antifibrinolytique des plaquettes. Au contraire l'activation en temps voulu du facteur XII est peut-être nécessaire à la manifestation de cette activité puisque celle-ci est liée à la fonction thrombodynamique qui s'exerce elle-même par une métamorphose visqueuse des plaquettes.

Nous pensons que les notions contradictoires antérieurement publiées sur le comportement de plaquettes vis-à-vis du système de la fibrinolyse sont dues probablement à des conditions d'expériences et de préparation des plaquettes variables d'un travail à l'autre et le plus souvent non précisées.

C H A P I T R E I X
* * * *

ETUDE DE L'INFLUENCE DU FIBRINOGENE SUR L'AMPLITUDE MAXIMA. DU PDP

Le fibrinogène est le second facteur important dont le rôle est lui aussi connu depuis longtemps ainsi que nous l'avons dit précédemment.

Pour Hartert (34-35) le fibrinogène influence E_m selon une fonction sigmoïde.

Plus récemment Sokal (94-95) et Vreeken (108) en employant des concentrations croissantes de fraction I ont trouvé que la relation entre E_m et le fibrinogène est pratiquement linéaire.

Pour Samama et Prost (81) A_{m2} est une fonction sinusoïdale du fibrinogène: de 0 à 10 g/litre la forme de la courbe est très étalée et son point d'inflexion correspond à un taux de fibrinogène de 5 g/litre mais en pratique jusqu'à des valeurs de 10 g/litre on peut assimiler la courbe à une droite. Selon ces auteurs, cette courbe devient asymptotique pour des taux de fibrinogène de 10 g/litre.

Il nous a paru intéressant de reprendre cette étude de l'influence du fibrinogène sur l'amplitude maxima du PDP.

TECHNIQUE

1°- Préparation des réactifs

Nous avons préparé du plasma déplaquetté par centrifugation pendant 20 min. à 4500 tours/minute à 4° C en matériel siliconé auquel nous faisons subir ensuite 3 congélations-décongélations successives pour le débarrasser des plaquettes restant en suspension. Ce PDP servira :

- soit pour être dilué dans les expériences d'appauvrissement
- soit pour être défibrinogéné.

Ce PDP déplaquetté est défibrinogéné

- par la bentonite RP
- par la thrombine.

a) Par la bentonite

Nous avons utilisé la technique décrite par J-P. Soulier (96) qui a montré que la bentonite adsorbe plus ou moins les différents facteurs de coagulation selon la concentration que l'on utilise. Aux plus faibles concentrations (5 p.1000 poids-volume) le fibrinogène est entièrement adsorbé avec aussi 50 pour 100 du facteur VIII. Ceci ne nous a pas gêné dans nos expériences et nous n'observons aucun allongement de r . On sait en effet que r reste normal tant qu'il y a au moins 25 p.100 de facteur VIII.

5 cm³ de plasma déplaquetté sont donc mis en présence de 25 mg de bentonite. On agite de façon continue pendant 10 minutes puis on centrifuge 5 minutes à 4500 tours/minute. Le fibrinogène étant adsorbé par la bentonite, le plasma surnageant ne doit plus en contenir. On le vérifie en ajoutant à une petite partie de ce plasma quelques gouttes d'une solution au 1/100 de thrombine (Thrombase Roussel : 1 ampoule de poudre diluée dans 5 cm³ d'eau physiologique, cette solution étant ensuite rediluée au 1/100) : on ne doit observer aucune formation de caillot. Ceci se vérifie tant que la quantité initiale de fibrinogène n'est pas supérieure à 4 g/litre. En cas contraire il faut recommencer l'adsorption en utilisant la bentonite à 2,5 ou 5 p.1000 selon les cas.

b) Par la thrombine

Le plasma déplaquetté est mis en présence de 2 gouttes de thrombine au 1/100 préparée à partir d'une ampoule de Thrombase Roussel : le fibrinogène se transforme en caillot de fibrine. On incube en présence du caillot pendant une heure à 37° pour se débarrasser de la thrombine par le jeu des antithrombines 1 et 3. On centrifuge alors pendant quelques minutes à 4000 tours/minute et on recueille le plasma défibrinogéné surnageant. On vérifie l'absence de thrombine en mélangeant une petite partie de ce plasma à parties égales avec un PDP non traité : on ne doit observer aucune coagulation, sinon on poursuit l'incubation.

Les expériences faites avec du plasma défibrinogéné selon l'une ou l'autre méthode donnent des résultats identiques.

2° - Nous avons alors utilisé plusieurs types d'expériences :

- appauvrissement d'un PDP en fibrinogène par dilution à l'aide d'un PDP traité par la bentonite. Parmi les PDP que nous avons dilué, certains étaient normaux, d'autres étaient volontairement choisis hyperfibrinémiques.

- enrichissement d'un FDP défibrinogéné par plusieurs types de fractions plasmatiques renfermant du fibrinogène, qui nous ont été aimablement fournis par M. Steinbuch au Centre National de Transfusion Sanguine.

- enrichissement du plasma d'une malade atteinte d'afibrinogénémie congénitale avec les mêmes fractions que dans les expériences précédentes. Ces quelques expériences nous ont donné les mêmes courbes que les expériences précédentes, même après incubation du plasma afibrinogénémique avec la fraction contenant le fibrinogène. Le plasma d'afibrinogénémie congénitale ne présente donc pas d'activité antifibrinogène.

A/ Expériences d'appauvrissement d'un PDP en fibrinogène

Le PDP est progressivement dilué à l'aide de PDP de même origine défibrinogéné. La dilution du PDP étant faite non pas en eau physiologique mais en plasma défibrinogéné il n'y a pas de dilution d'autres facteurs que le fibrinogène : celui-ci est donc bien la seule variable de l'expérience.

Le taux de fibrinogène est vérifié au départ et après chaque dilution par la méthode pondérale.

Résultats

15 expériences de ce type nous ont permis de tracer les courbes individuelles des variations de Am2 en fonction du taux de fibrinogène et d'en tirer une courbe moyenne (fig. XXIX).

Dans nos expériences nous constatons que Am2 est une fonction exponentielle du taux de fibrinogène.

La courbe obtenue montre une diminution, régulière de Am2 en fonction de l'appauvrissement progressif en fibrinogène.

Am2 est voisin de 20 mm pour des taux de fibrinogène de 3 g/litre ce qui correspond bien à notre statistique portant sur 500 sujets normaux, dans laquelle la valeur moyenne, de 3,25 g/litre de fibrinogène, correspond à une amplitude maxima de 22 mm.

B/ Expériences d'enrichissement progressif en fibrinogène d'un PDP défibrinogéné.

Nous avons utilisé des PDP défibrinogénés soit par la bentonite soit par la thrombine et les avons enrichis progressivement avec différentes fractions plasmatiques contenant du fibrinogène.

Résultats

- Fraction I de Cohn standard contenant 50 p.100 de protéines dont 40 p.100 de protéines coagulables.

Nous avons utilisé des concentrations variant de 2,5 à 70 mg de fraction I par ml soit 0,5 à 14 g de fibrinogène/litre.

Les premiers échantillons nous ont donné de très mauvais résultats : l'amplitude maxima des diagrammes ne dépassait jamais quelques millimètres quelle que soit la concentration utilisée. Avec un second lot nous avons eu de meilleurs résultats et la courbe moyenne obtenue après 10 expériences montre une augmentation progressive et régulière de Am2 (Fig. XXXI).

Des taux de 15 mg/ml ce qui correspond à 3 g de fibrinogène/litre sont nécessaires pour obtenir des amplitudes normales voisines de 20 mm.

La constante longitudinale r reste normale pour les concentrations correspondant à des taux physiologiques. Puis elle d'allonge progressivement et au-delà de 50 mg/ml soit 10 g/litre de fibrinogène, r est infini.

- Fraction 1 de Cohn du plasma humain ou bovin purifiée selon la méthode de Blömbäck (4)

Cette fraction contient 50 p.100 des protéines dont 97 p.100 de protéines coagulables.

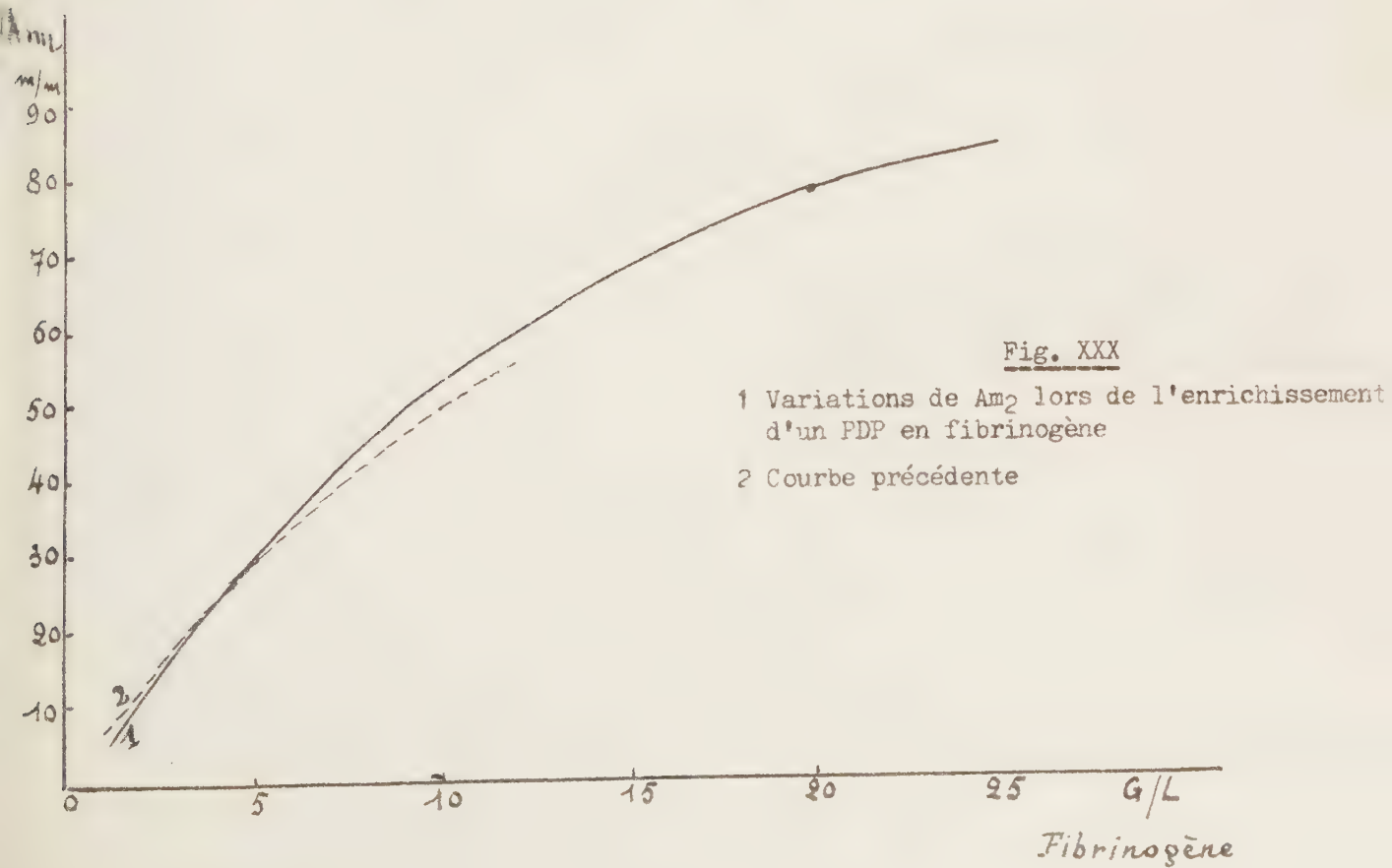
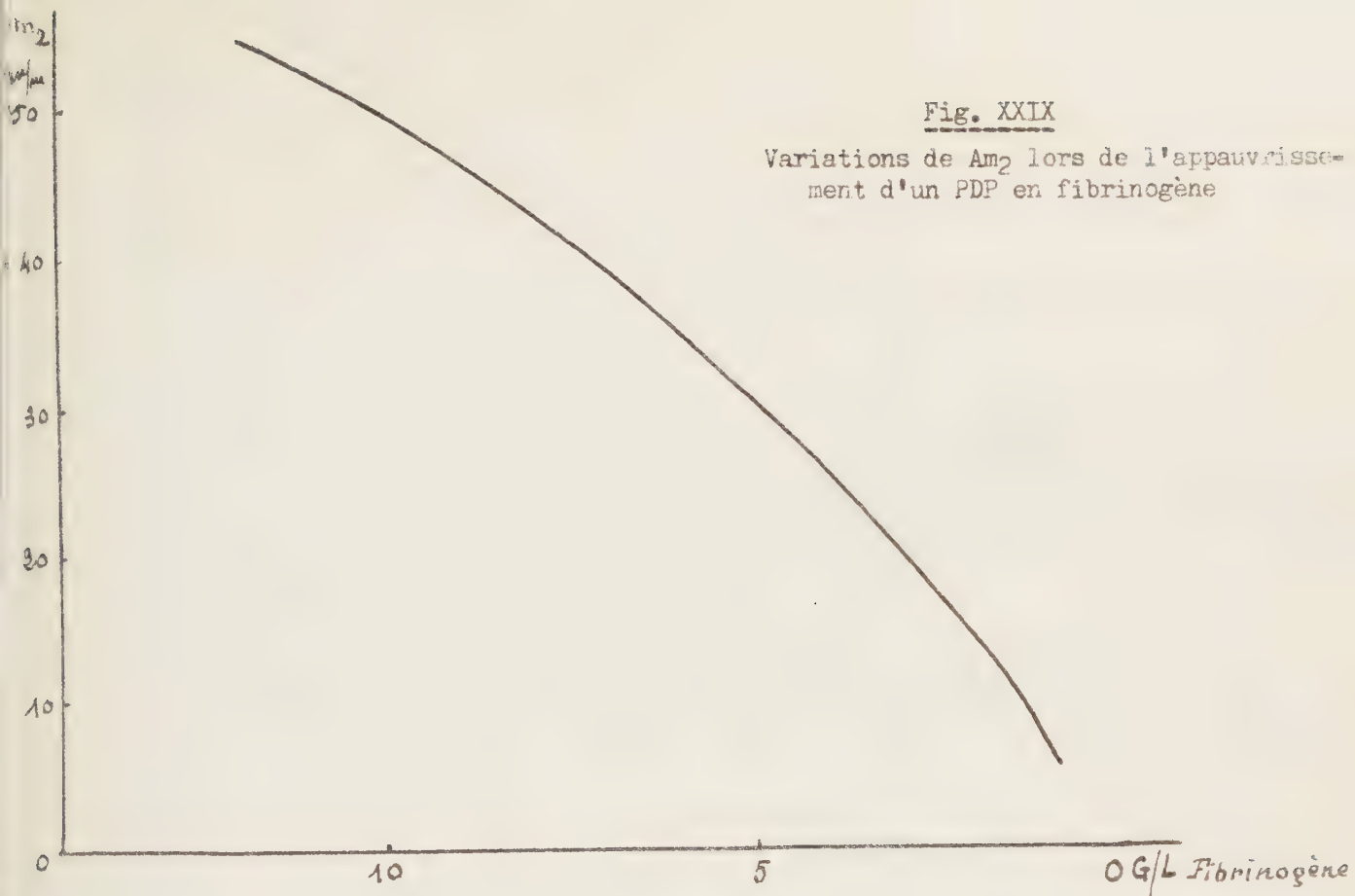
Nous avons enrichi nos PDP défibrinogénés avec des concentrations de cette fraction variant de 2,5 à 100 mg/ml soit 1,2 à 48 g de fibrinogène/litre.

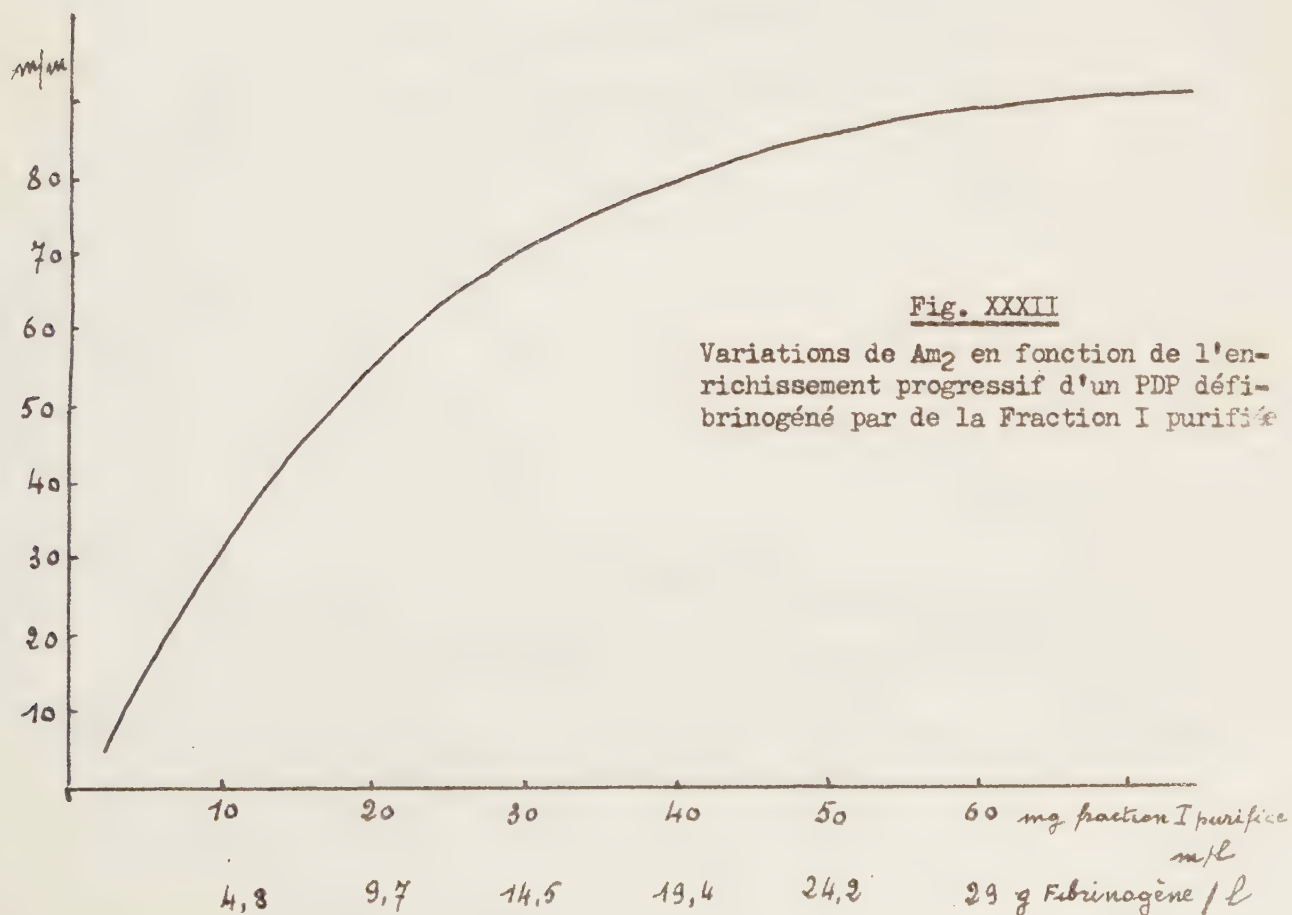
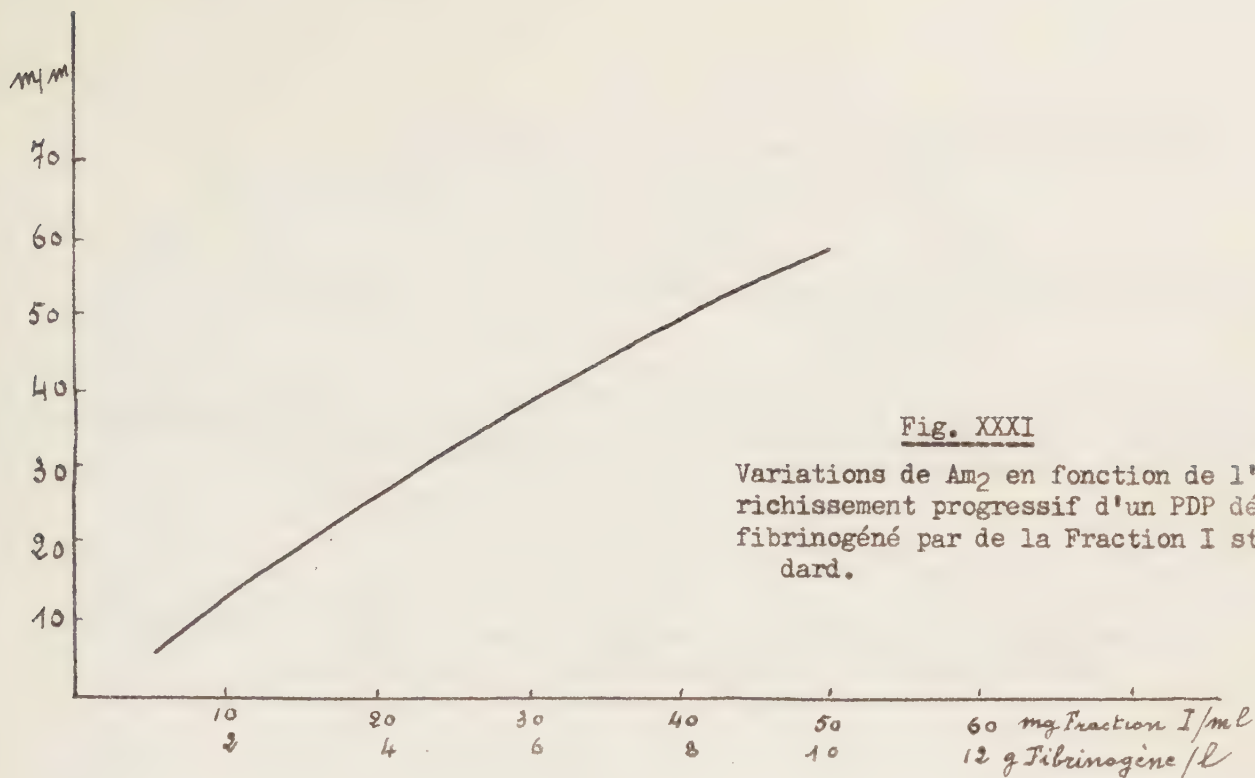
Les 12 expériences nous ont permis de tracer une courbe moyenne (Fig. XXXII) qui montre une augmentation de Am2 d'abord assez rapide puis plus lente. La courbe tend finalement vers un plateau et entre 50 et 90 mg/ml, soit 24 à 48 g/litre de fibrinogène on n'observe pratiquement plus de variations.

Avec des doses voisines de 6 mg/ml soit 3,15 g/litre de fibrinogène on obtient une amplitude normale voisine de 20 mm. Ceci correspond encore bien à notre statistique.

En contrôlant régulièrement le taux de fibrinogène par la méthode pondérale lors de l'enrichissement progressif nous avons pu tracer une courbe des variations de Am2 en fonction du taux de fibrinogène : celle-ci reproduit à peu de choses près celle obtenue par dilution du PDP/défibrinogéné (fig.XXX).
dans du PDP

Les expériences réalisées avec la fraction I du plasma de boeuf donnent des courbes exactement parallèles.





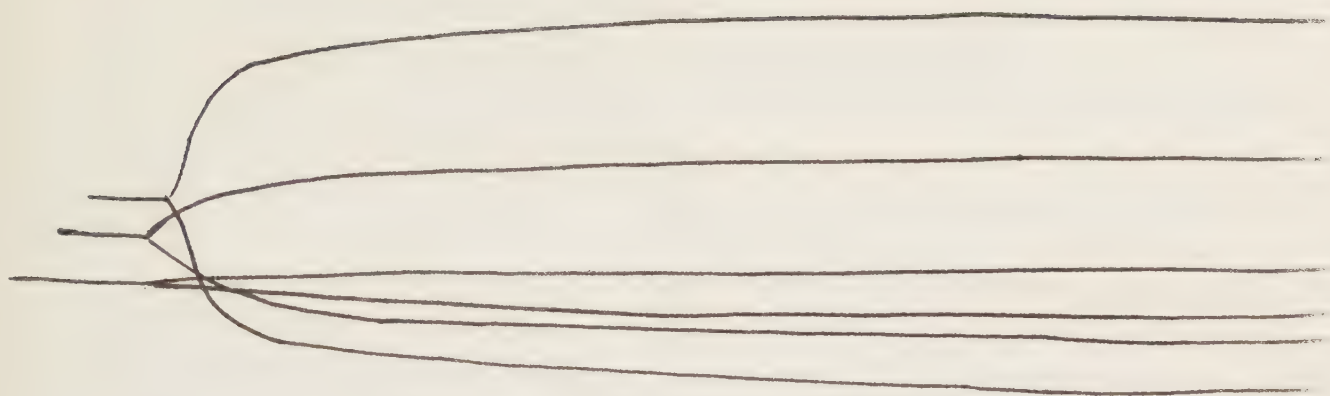


Fig. XXXIII : de bas en haut :

Enrichissement progressif d'un PDP défibrinogéné par de la fraction I type Blomback (1 - 5 et 10 g pour 1000)

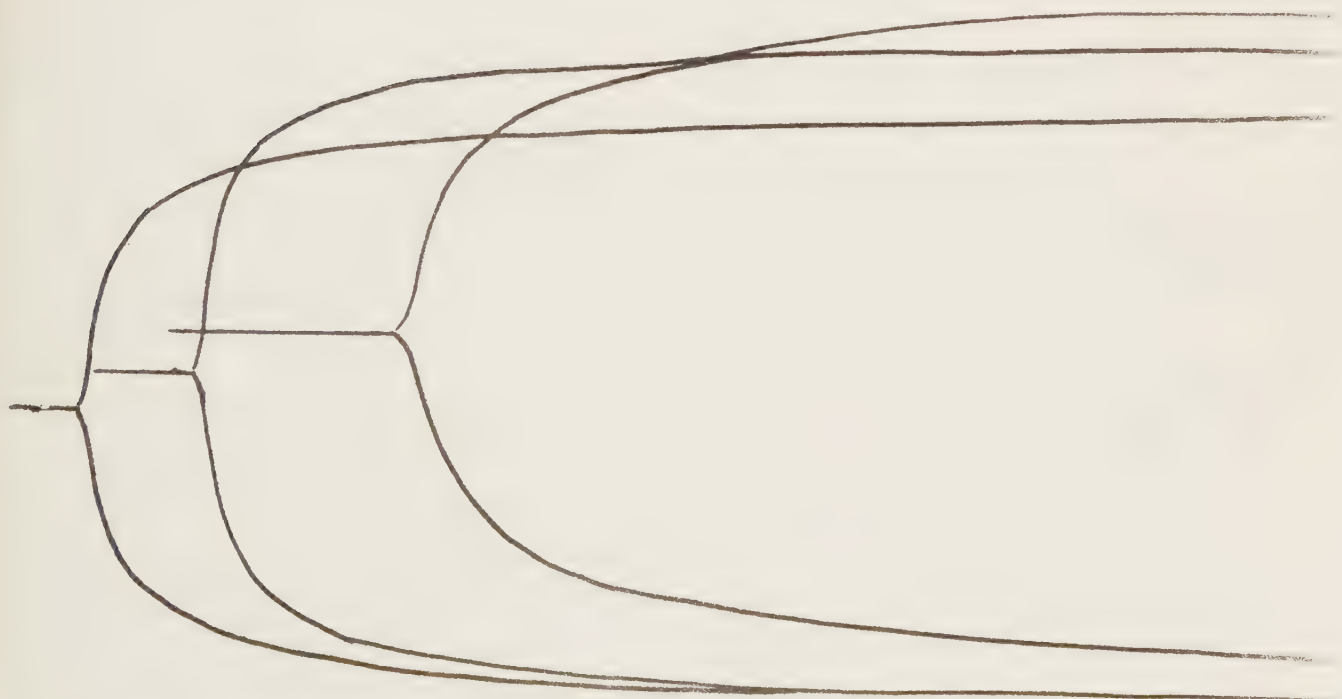


Fig. XXXIV : de bas en haut :

Enrichissement progressif d'un PDP défibrinogéné par de la fraction type Blomback (20 - 30 et 50 g pour 1000)

- Fraction I de Cohn de plasma humain, purifié, contenant 50 p.100 de protéines dont 80 p.100 de protéines coagulables.

Les résultats obtenus dans 12 expériences sont à peu près parallèles aux précédents : il faut cependant des quantités un peu plus importantes 7,5 à 8 mg/ml pour obtenir des valeurs normales de l'amplitude maxima.

Dans ces deux derniers types d'expériences la constante longitudinale r reste normale pour des taux correspondant aux variations physiologiques et même aux hyperfibrinémies courantes, mais au-delà d'une concentration de 50 mg/ml r s'allonge progressivement et finalement au delà de 90 mg/ml, on n'obtient plus qu'un tracé linéaire.

- Fibrinogène "Chilcott"

Quelques essais nous ont donné des amplitudes maxima voisines de 20 mm pour des quantités de fibrinogène correspondant à 3 g/litre, mais très rapidement quand on augmente la quantité de fibrinogène on n'obtient plus aucune coagulation.

Au delà d'une certaine concentration en fibrinogène on note donc l'existence d'un effet inhibiteur de la coagulation pouvant aller jusqu'à supprimer pratiquement toute possibilité de coagulation enregistrable.

La première idée qui nous est venue à l'esprit est que plus on ajoute de fraction I, plus on ajoute de citrate et que l'on change donc les conditions de recalcification.

Nous avons alors repris les expériences en utilisant des concentrations croissantes de calcium mais sans changer les résultats. Cet effet inhibiteur de fibrinogène aux fortes concentrations n'est donc pas un artéfact dû à la présence de citrate en trop grande quantité.

Nous avons vérifié qu'il n'est pas dû non plus à la présence éventuelle de traces d'héparine dans la fraction I étudiée.

Il ressemble donc à un effet d'adsorption de la thrombine sur le caillot : effet antithrombine 1, à moins qu'il ne s'agisse de l'effet décrit par Copley (18-19-20-21). Pour cet auteur le plasma mis en contact avec de la poudre de fibrine transporte un effet anticoagulant dans les plasmas natifs fraîchement préparés auquel on le mélange.

Ce phénomène a été retrouvé et décrit aussi par Triantaphyllopoulos (101 - 102 - 103 - 104 - 105 - 106). Cet auteur note que le fibrinogène incubé possède un effet anticoagulant et allonge le temps de thrombine d'un plasma normal auquel on le mélange. Il appelle la fraction contenant toute l'activité antithrombine du fibrinogène incubé : anticoagulant fraction of incubated fibrinogen (A.F.I.F.). Cette fraction posséderait une action antithrombine de type compétitif.

Nous avons d'abord pensé que l'hypothèse de l'antithrombine n° 1 était la bonne (51 - 52) mais de nouvelles recherches nous incitent à réviser notre première opinion et à mettre également en cause un phénomène antithrombinique humoral comparable à celui décrit par Copley et Triantaphyllopoulos et assimilable à aucune des antithrombines actuellement prises en considérations.

Dans cinq essais préliminaires nous avons incubé du fibrinogène défibrinogéné :

TECHNIQUE -

80 mg de fraction I purifiée (contenant 50 % de protéines dont 80 % de protéines coagulables) sont dissous dans 1 ml de PDP normal défibrinogéné par la bentonite.

On ajoute du Cl_2Ca aux concentrations habituellement utilisées en thrombo-dynamographie.

On incube une demi-heure à 18° C.

Le sérum obtenu est ajouté en quantités progressivement croissantes dans un PDP normal et on enregistre des diagrammes : le PDP normal est ainsi dilué au 1/4, au 1/3 et au 1/2.

On enregistre parallèlement les diagrammes de PDP normaux dans les mêmes conditions de dilution mais auxquels on n'a pas ajouté ce sérum.

RESULTATS -

On obtient un allongement progressif de la constante r proportionnel aux quantités de sérum ajouté.

Lorsque le PDP est dilué au 1/3 avec le sérum on n'obtient plus aucune coagulation.

Parallèlement l'amplitude de Am_2 diminue progressivement (Fig. XXXIV bis et ter). L'effet anticoagulant du fibrinogène incubé est donc transportable dans des plasmas normaux.

- CONCLUSIONS -

Plusieurs faits ressortent de cette étude :

- La courbe de variation de l'amplitude maxima du PDP en fonction du taux de fibrinogène est exponentielle et pratiquement linéaire dans la zone des variations physiologiques. Dans nos expériences la courbe ne devient asymptotique que pour des taux de fibrinogène supérieurs à 20 g/litre. Ceci tient probablement à la différence de fractions utilisées (Prost avait utilisé la fraction I standard) et les chiffres montrent bien en effet que les résultats varient selon la fraction employée.

- L'effet inhibiteur aux fortes concentrations de fibrinogène n'est pas un artéfact dû à la présence du citrate en trop grandes quantités puisqu'une recalcification tenant compte de cette possibilité ne corrige pas cet effet. Nous avons vérifié qu'il n'est pas dû non plus à la présence éventuelle de traces d'héparine dans la fraction I étudiée. Cet effet anticoagulant est transportable dans des plasmas normaux. Il s'agit d'un inhibiteur différent des 6 antithrombines classiques.

- Nous notons encore une grande différence d'activité entre les types de fractions, certaines étant à peu près inutilisables en thérapeutique. Les courbes obtenues avec ces différentes fractions présentent en effet des pentes assez différentes. Cette étude thrombodynamographique de l'activité des fractions contenant du fibrinogène sur le PDP défibrinogéné pourrait servir de test à l'évaluation de la qualité d'une fraction thérapeutique : la fraction est d'autant plus active que la pente de la courbe est plus grande.

On peut d'autre part par le même procédé calculer la quantité de fraction à transfuser pour obtenir une correction thérapeutique convenable (Am_2 supérieur à 10 mm). Ceci est particulièrement intéressant dans le traitement substitutif de s afibrinogénémies congénitales dont nous avons vu que le plasma se comporte exactement comme un plasma défibrinogéné et ne présente aucune activité antifibrinogène.

Certaines fractions, tel le fibrinogène "Chilcott", qui d'ailleurs ne sont pas destinées à l'usage thérapeutique, présentent très rapidement un effet inhibiteur de la coagulation qui les rend difficilement utilisables dans les études thrombodynamographiques.

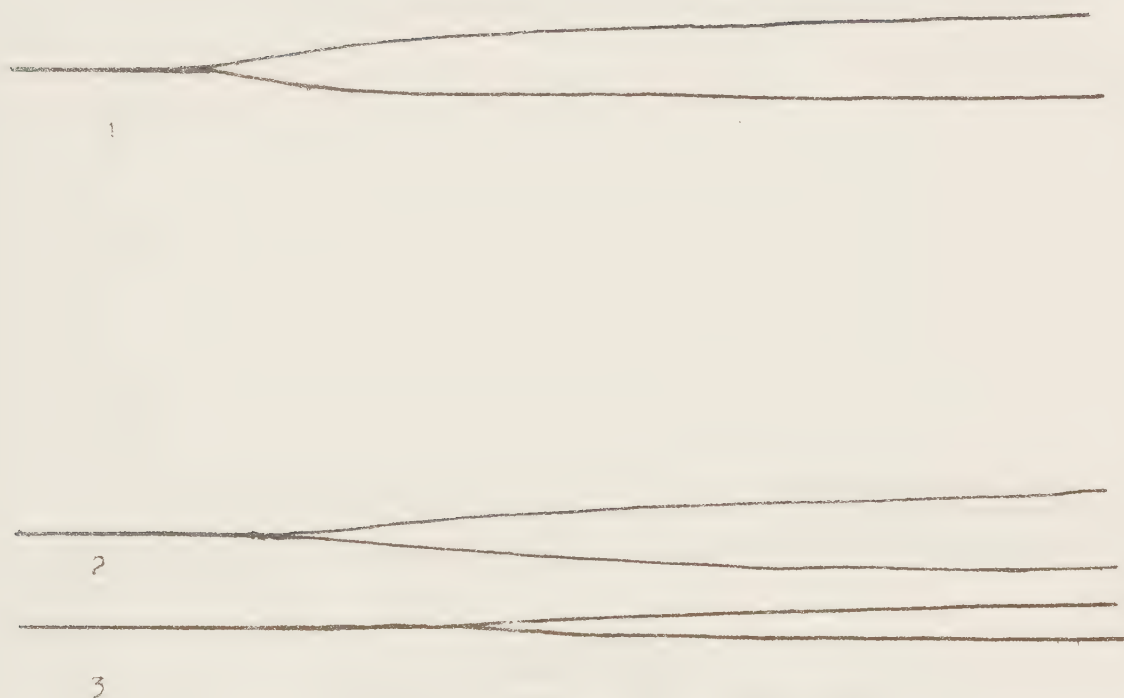


Fig. XXXIV bis

Influence du sérum obtenu après coagulation de fraction I
purifiée, sur l'amplitude maxima d'un PDP normal.

- 1 PDP normal
- 2 PDP dilué au 1/4 par du tampon
- 3 PDP dilué au 1/4 par le sérum



Fig. XXXIV ter

Influence du sérum obtenu après coagulation
de Fraction I purifiée, sur l'amplitude maxima
d'un PDP normal

en haut 1 - PDP dilué au $1/3$ en eau physiologique
2 - PDP dilué au $1/3$ par le sérum

en bas 1 - PDP dilué au $1/2$ en eau physiologique
2 - PDP dilué au $1/2$ par le sérum

C H A P I T R E X

* * *

DEMONSTRATION PAR LA STATISTIQUE CLINIQUE
DE L'EXISTENCE D'AUTRES FACTEURS QUE LE FIBRINOGENE
DANS LES VARIATIONS DE L'AMPLITUDE MAXIMA DU PDP

Les expériences précédentes d'enrichissement d'un PDP défibrinogéné montrent une concordance mathématique entre le taux de fibrinogène et la valeur de l'amplitude maxima du PDP.

Ceci est évident car on utilise un PDP connu et la seule variable de l'expérience est ici le fibrinogène.

Mais en clinique le problème est probablement plus compliqué car le fibrinogène n'est peut-être plus la seule variable.

Nous avons dressé une statistique des variations du taux de fibrinogène en fonction de la valeur de Am₂ chez 500 sujets normaux (tableau n° 8) et chez 300 sujets hyperfibrinémiques (tableau n° 11) pris au hasard.

Dans ces tableaux nous avons noté pour chaque valeur de Am₂ les valeurs moyennes et extrêmes des autres variables.

Inversement nous avons dressé des tableaux des variations de Am₂ en fonction du taux de fibrinogène (tableaux 9 et 10).

Nous avons ensuite porté :

- en abscisse : les taux du fibrinogène
- en ordonnée : les valeurs moyennes et extrêmes de Am₂

Nous obtenons alors une grande dispersion des points (Fig. XXXV - XXXVI - XXXVII - XXXVIII).

Il existe évidemment une concordance d'ensemble puisque le taux du fibrinogène est un facteur de variation de l'amplitude maxima. Mais les variations individuelles sont si nombreuses et si considérables qu'il faut bien admettre que le taux du fibrinogène n'est plus la seule variable en cause en clinique.

Voici quelques exemples :

Sujets normaux -

<u>Fibrinogène en g/litre</u>	<u>Am₂ en mm</u>	<u>Nombre de cas</u>
2,1	8,5	1
	14	4
	23	1

<u>Fibrinogène en g/litre</u>	<u>Am₂ en mm</u>	<u>Nombre de cas</u>
3	14	2
	16	3
	18	3
	20	4
	22	4
	23	5
	29	1
3,8	12	1
	21,5	3
	26,5	4
	30	1
4	17	1
	22	4
	24	4
	25	11
	28	3
	34	1
4,2	14	1
	22	5
	25	8
	29	3
	32	1

Ainsi les valeurs de Am₂ peuvent varier du simple au double ou même au triple pour un même taux de fibrinogène.

Inversement :

<u>Am₂ en mm</u>	<u>Fibrinogène en g/litre</u>	<u>Nombre de cas</u>
12	1,9	1
	2,1	1
	2,3	1
	3,8	1
15	1,9	1
	2,1	1
	2,3	1
	3	2
	3,5	1
20	2	2
	2,9	5
	3,5	1
	4,4	1

<u>Am₂ en mm</u>	<u>Fibrinogène en g/litre</u>	<u>Nombre de cas</u>
25	2,8	1
	3,5	1
	3,8	1
	3,9	11
	4,2	8
	4,5	3

Sujets hyperfibrinémiques -

<u>Fibrinogène en g/litre</u>	<u>Am₂ en mm</u>	<u>Nombre de cas</u>
4,8	18	1
	28	2
	33	1
5	23,5	1
	26	2
	27	2
	29	3
	30	2
	32	2
	38	1
6,4	27	1
	30	3
	31	2
	33	2
	35	1
	41	1
6,9	35	1
	37	2
	39	1
	49	1
8,3	38	1
	40	2
	45	1
	49	1
10	43	1
	48	2
	50	2
	55	1

Inversement :

<u>Am₂ en mm</u>	<u>Fibrinogène en g/l</u>	<u>Nombre de cas</u>
26	4,6	1
	5	2
	5,5	3
	5,8	1
	6,5	1
30	4,7	2
	5	2
	5,3	3
	6,4	3
	6,8	2
33	4,6	1
	5,3	2
	5,6	2
	5,9	2
	6,4	2
	7,5	1
	7,9	1
	8	1
	8,4	1
37	5,5	1
	6,3	2
	6,9	2
	7,1	1
	7,5	1
43	6	1
	6,6	1
	7	2
	8,4	1
	8,8	1
	9,7	1
	10	1

Nous n'avons pas observé non plus de variations concordantes de la constante A_p avec le taux de fibrinogène.

On ne peut donc pas dire que le taux du fibrinogène modifie A_p pour son propre compte d'une façon significative.

- CONCLUSION -

Nous voyons donc qu'il est impossible en clinique d'établir une relation simple entre l'amplitude maxima du PDP, la valeur de A_p et le taux du fibrinogène.

Bien qu'une concordance d'ensemble ~~entre~~ Am_2 et le taux de fibrinogène soit indiscutable, cette absence de concordance individuelle démontre clairement que d'autres facteurs que le fibrinogène interviennent dans l'amplitude maxima du PDP.

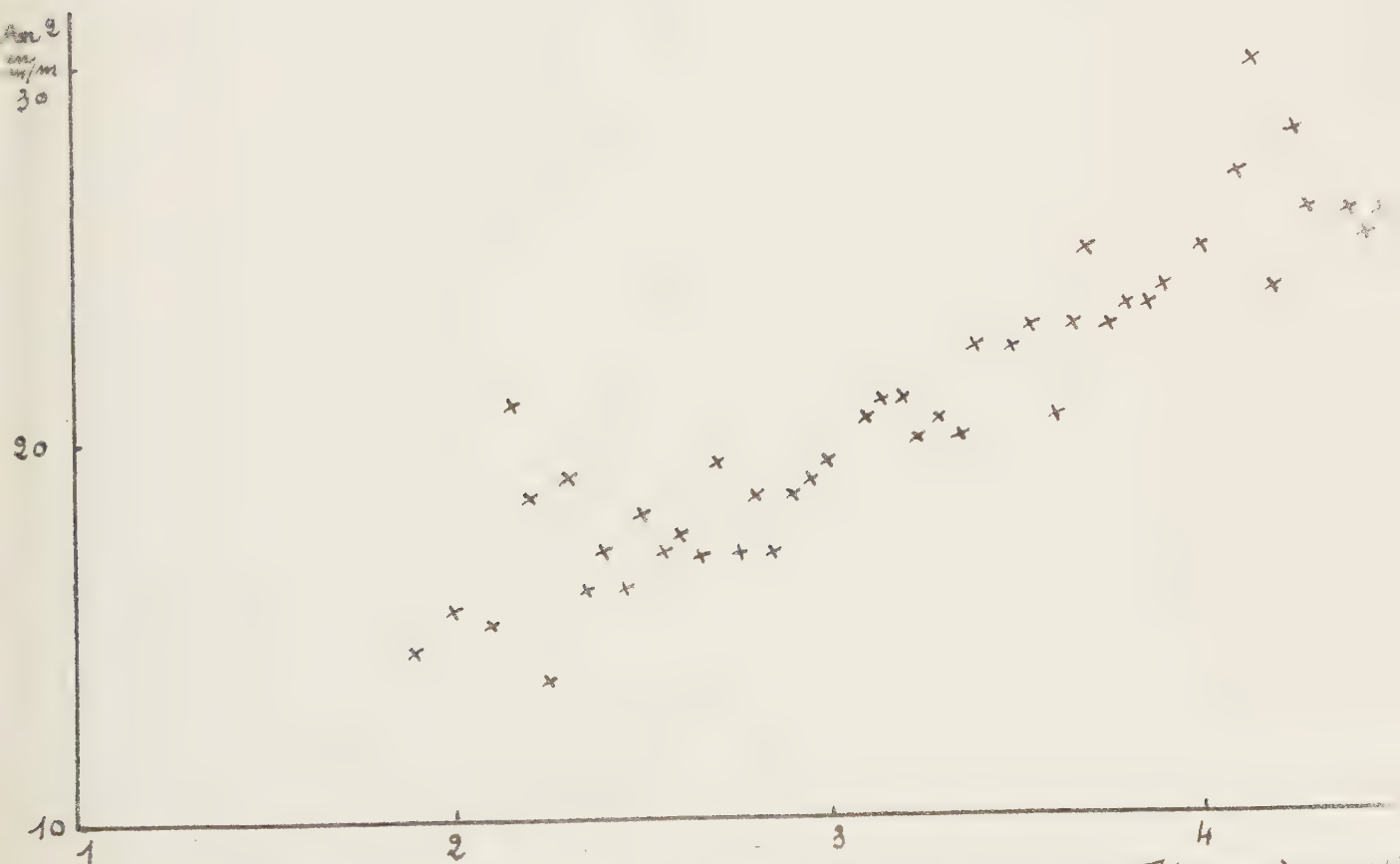
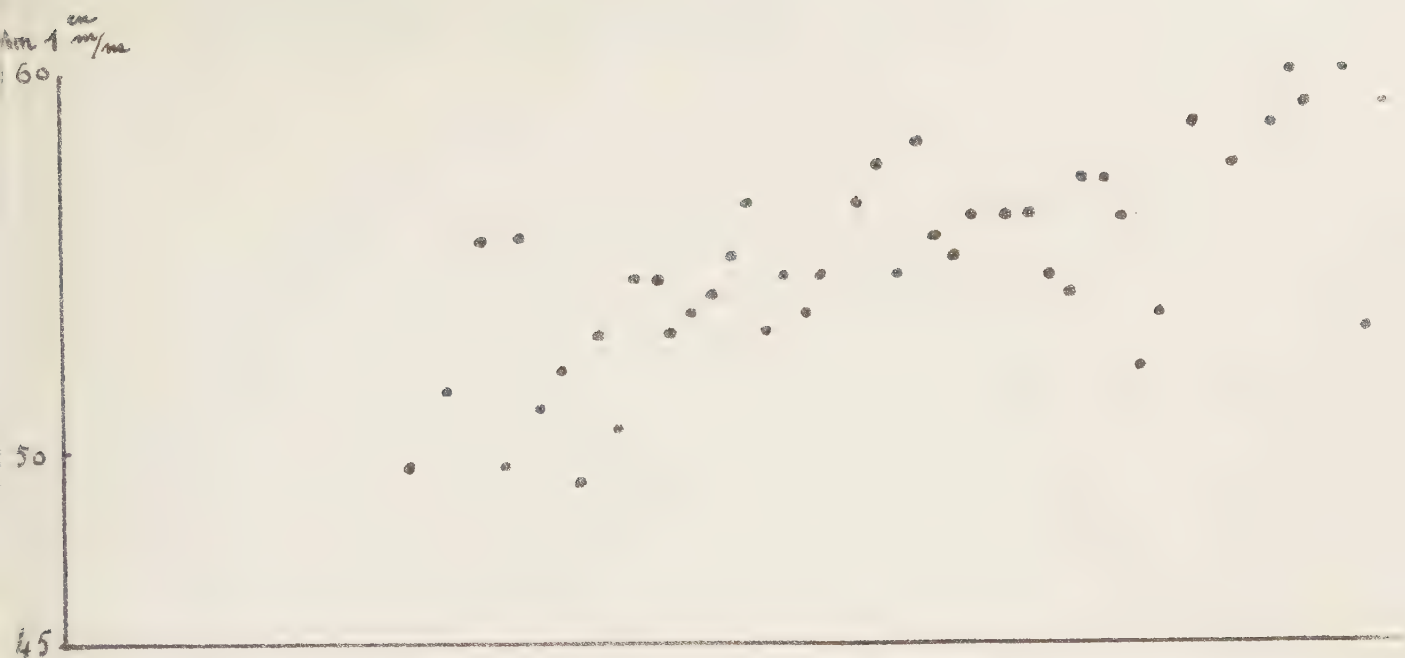


Fig. XXXV : Variations de Am₁ et Am₂ en fonction du taux de fibrinogène. Fibrinogène en g/l
valeurs moyennes obtenues dans une statistique portant sur
500 sujets normaux.

Fig. XXXVI

Valeurs extrêmes de Am_2 en fonction du taux de fibrinogène
dans une statistique portant sur 500 sujets normaux

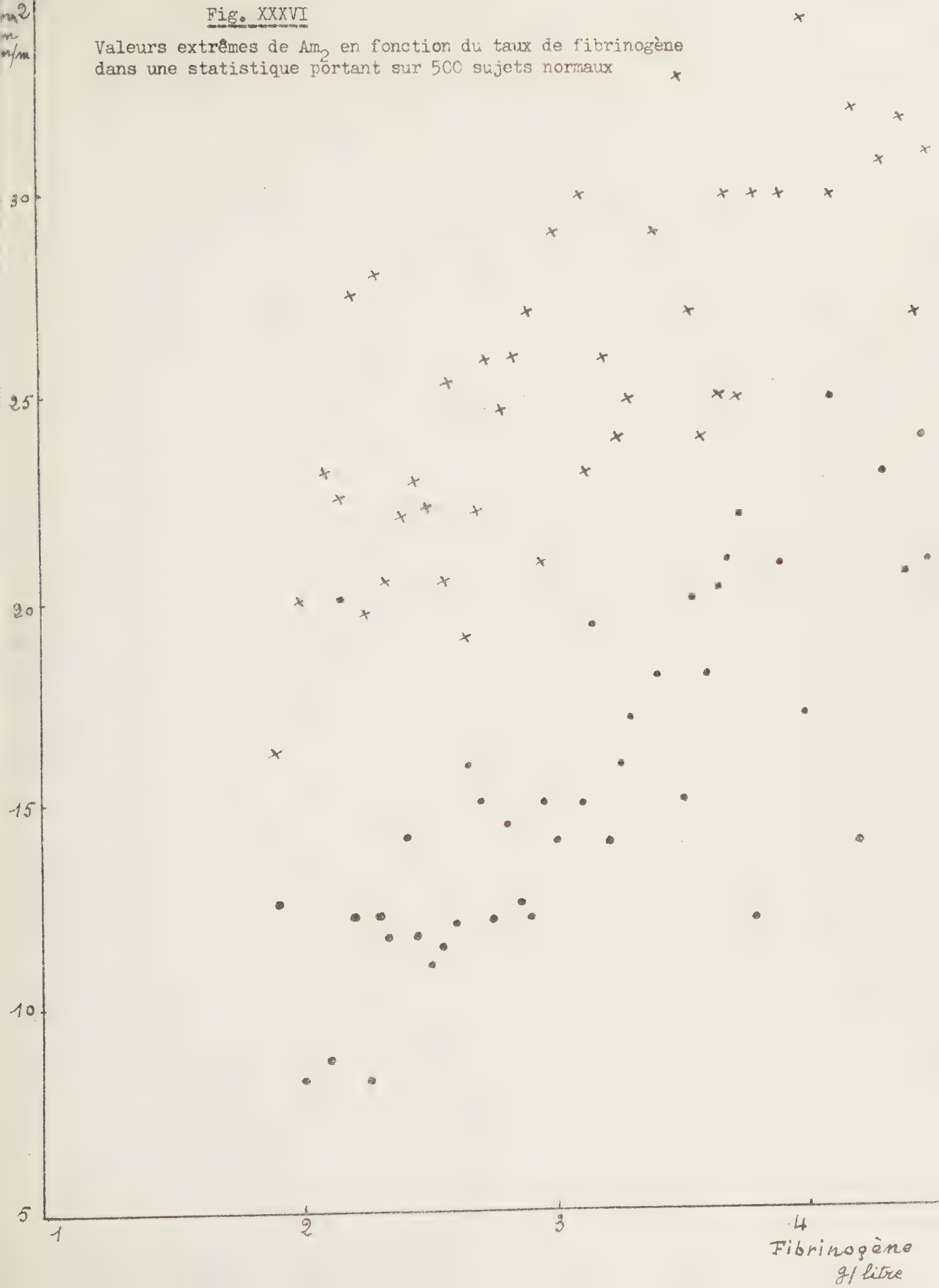


Fig. XXXVII

Variations de Am_1 et Am_2 en fonction du taux de fibrinogène : valeurs moyennes obtenues dans une statistique portant sur 300 sujets hyperfibrinémiques

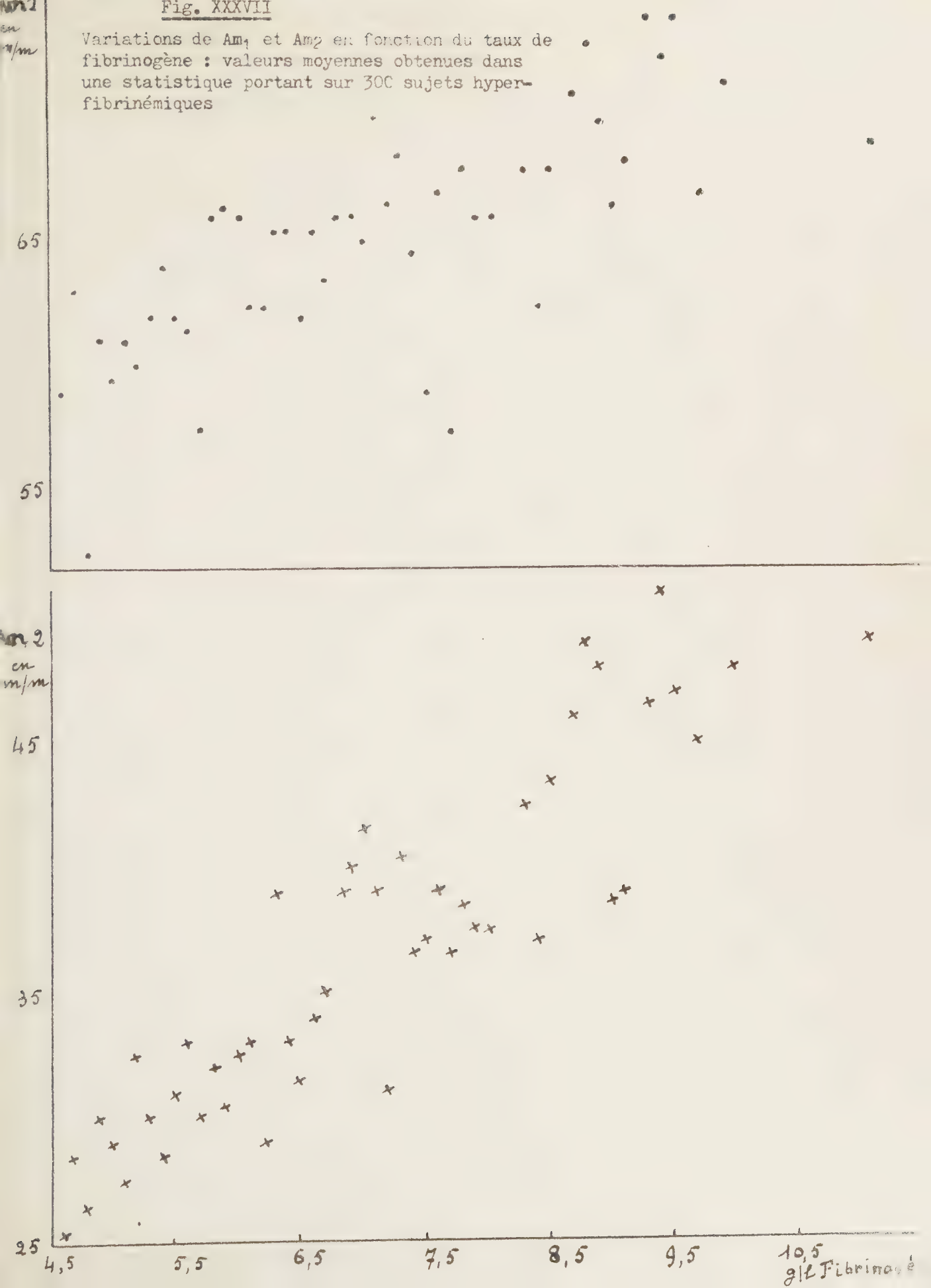


Fig. XXXVIII

Valeurs extrêmes de Am_2 en fonction du taux
de fibrinogène dans une statistique portant
sur 300 sujets hyperfibrinémiques

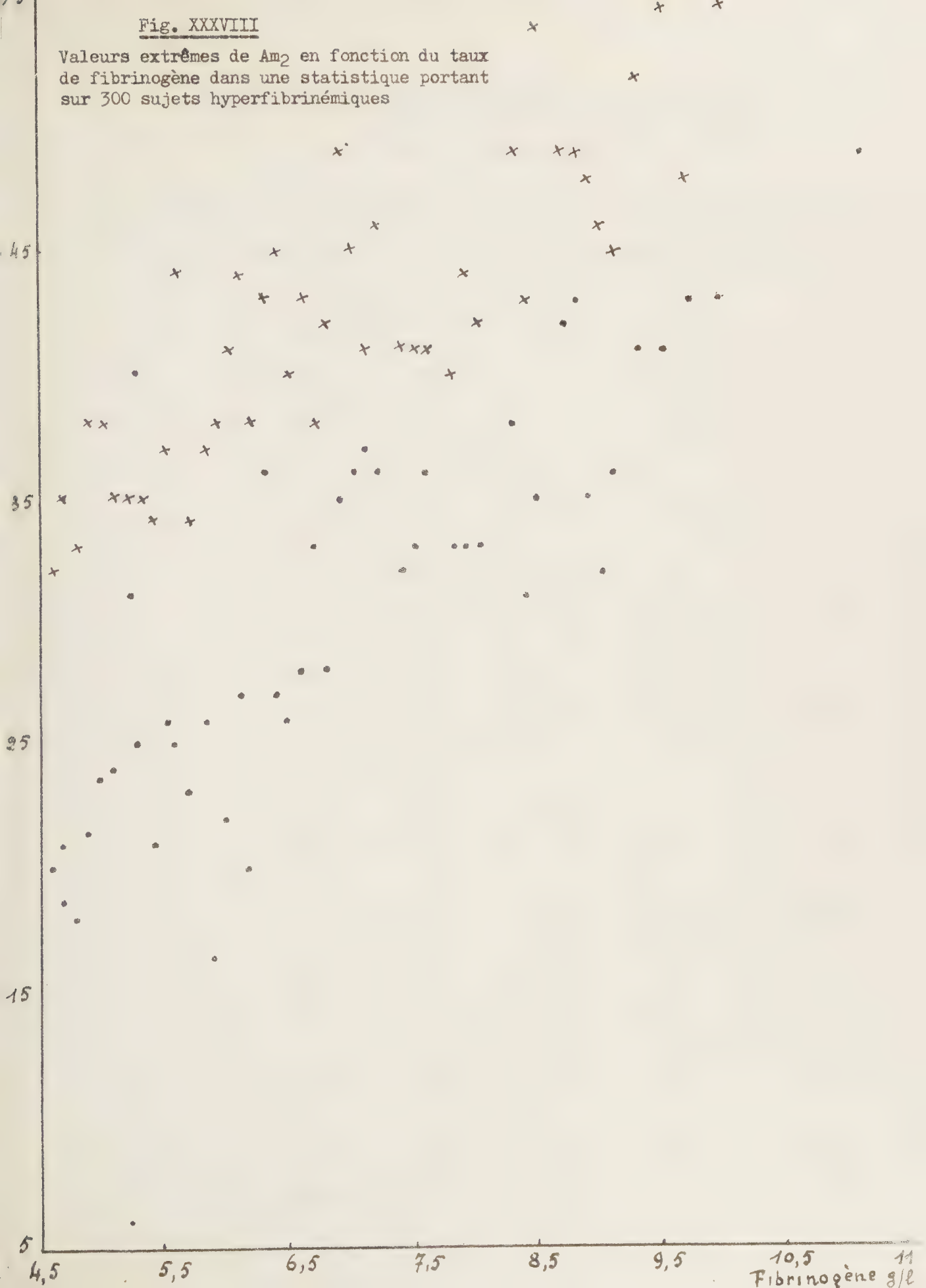


TABLEAU N° 8

VARIATIONS DU FIBRINOGENE EN FONCTION DE LA VALEUR DE Am2

chez 500 sujets normaux

Nombre de cas	Am2	Fibrinogène g/l.	Aml	Ap	Plaquettes/mm3
2	8 Valeurs extrêmes	2 2,25	47 55	39 47	234 000 170 000
	Moyenne :	2,10	51	43	202 000
1	8,5	2,1	57	48,5	300 000
	Moyenne :	2,1	57	48,5	300 000
1	11				
		2,5	50	39	160 000
	Moyenne :	2,5	50	39	160 000
3	11,5				
		2,35	46,5	35	180 000
		2,55	56	44,5	245 000
	Moyenne :	2,45	52	40,5	180 000
8	12				
		1,9	47,5	35,5	163 000
		3,8	57	45	330 000
	Moyenne :	2,5	52	40	254 000
1	12,5				
		2,85	49,5	37	210 000
	Moyenne :	2,85	49,5	37	210 000
6	13				
		2,1	48,5	35,5	162 000
		2,9	54,5	41,5	276 000
	Moyenne :	2,5	52	39	218 000
2	13,5				
		2,45	47	33,5	250 000
		2,6	55	41,5	175 000
	Moyenne :	2,5	51	37,5	212 000
12	14				
		2,1	48	25,5	155 000
		4,2	56	48	325 000
	Moyenne :	2,7	52,5	38	244 000

Nombre de cas	Am2	Fibrinogène g/l.	Am1	Ap	Plaquettes/mm ³
7	14,5				
	Valeurs	1,9	46	31,5	217 000
	extrêmes	2,8	62	48,5	218 000
	Moyenne :	2,4	53,5	39	252 000
22	15				
		2,1	46	31	130 000
		3,5	62,5	47,5	308 000
	Moyenne :	2,7	54	39	224 000
6	15,5				
		1,9	50	34,5	185 000
		3	61	45,5	260 000
	Moyenne :	2,4	55	39,5	228 000
18	16				
		2,1	46	30	170 000
		3,25	63	47	307 000
	Moyenne :	2,7	53	37	236 000
6	16,5				
		1,9	49	32,5	175 000
		3,1	65	48,5	307 000
	Moyenne :	2,4	54,5	38	243 000
20	17				
		2	46	28	150 000
		4	63	46	310 000
	Moyenne :	2,7	53,5	36,5	232 000
6	17,5				
		2,9	51	33,5	205 000
		3	57	39,5	300 000
	Moyenne :	2,9	53,5	36	259 000
29	18				
		2,1	46	26	120 000
		3,6	63	45	330 000
	Moyenne :	2,9	53	35	229 000
8	18,5				
		2,1	46	24,5	197 000
		3,5	61	42,5	281 000
	Moyenne :	2,9	53	34,5	243 000

Nombre de cas	Am2	Fibrinogène g/l.	Am1	Ap	Plaquettes/mm3
26	19				
	Valeurs	2,4	47	31	180 000
	extrêmes	4,2	63	45	317 000
	Moyenne :	2,95	55	36	245 000
10	19,5				
		2,25	47	27,5	170 000
		3,5	62	45	302 000
	Moyenne :	2,95	54	34,5	232 000
34	20				
		2	47	27	122 000
		4,4	62	42	312 000
	Moyenne :	3	54,5	34,5	242 000
8	20,5				
		2,2	46	24,5	170 000
		2,9	59	38,5	260 000
	Moyenne :	2,5	51	30,5	221 000
20	21				
		1,95	46	23	185 000
		4,5	65	44	327 000
	Moyenne :	3,25	55	35	251 000
9	21,5				
		3	46	24,5	120 000
		3,8	64	42,5	250 000
	Moyenne :	3,3	54	32,5	204 000
34	22				
		2,4	46	24	194 000
		4,5	64	42	317 000
	Moyenne :	3,3	55,5	33,5	259 000
5	22,5				
		2,15	51	28,5	200 000
		4	59	37	300 000
	Moyenne :	3,15	55	32,5	237 000
29	23				
		2,1	49	26	115 000
		4,5	66	43	298 000
	Moyenne :	3,35	56,5	33,5	232 000

Nombre de cas	Am2	Fibrinogène g/l.	Am1	Ap	Plaquettes/mm ³
5	23,5				
	Valeurs	2,8	49	26	200 000
	extrêmes	4,3	62	38,5	308 000
	Moyenne :	3,4	56	32,5	245 000
19	24				
		2,2	50	26	160 000
		4,45	65,5	43	300 000
	Moyenne :	3,6	56	32	225 000
6	24,5				
		2,8	50	25,5	150 000
		3,8	58	34	290 000
	Moyenne :	3,2	55	30,5	231 000
42	25				
		3,1	46	21	150 000
		4,5	66	41	305 000
	Moyenne :	4	58,5	33,5	244 000
3	25,5				
		2,6	54,5	29	170 000
		3,5	56	30,5	280 000
	Moyenne :	2,9	55	29,5	223 000
16	26				
		2,75	50	24	180 000
		4,5	66	40	316 000
	Moyenne :	3,8	59	33	260 000
5	26,5				
		3,8	53	26,5	178 000
		3,85	65	38,5	240 000
	Moyenne :	3,8	60	33,5	204 000
18	27				
		2,3	52	24	180 000
		4,5	65	38	318 000
	Moyenne :	3,8	56,5	29,5	250 000
5	27,5				
		2,2	50	22,5	212 000
		4	63	35,5	275 000
	Moyenne :	3,4	59	31,5	242 000
11	28				
		2,3	51	23	210 000
		4,5	66	38	290 000
	Moyenne :	3,7	58	30	245 000

Nombre de cas	Am2	Fibrinogène g/l	Am1	Ap	Plaquettes/mm3
3	28,5				
	Valeurs	4	60	31,5	152 000
	extrêmes	4,4	65	36,5	268 000
	Moyenne :	4,2	62	33,5	221 000
13	29				
		3	52	23	175 000
		4,5	66	37	282 000
	Moyenne :	4	60	31	226 000
14	30				
		3,1	50	20	215 000
		4,5	65	38	310 000
	Moyenne :	3,9	60,5	30,5	267 000
3	31				
		4	50	19	203 000
		4,5	61	30	306 000
	Moyenne :	4,25	54	23	267 000
2	32				
		4,2	59	27	252 000
		4,4	63	31	290 000
	Moyenne :	4,3	60	28	271 000
1	33				
		3,5	63	30	300 000
	Moyenne :	3,5	63	30	300 000
1	34,5				
		4	65	31,5	240 000
	Moyenne :	4	65	31,5	240 000

TABLEAU N° 9

VARIATIONS DE Am2 EN FONCTION DU TAUX DE FIBRINOGENE

chez 500 sujets normaux

Nombre de cas	Fibrinogène g/l.	Am2	Am1	Ap	Plaquettes mm/3
4	1,9				
	Valeurs	12	49	32,5	175 000
	extrêmes	16,5	50	38	257 000
	Moyenne :	14,5	49,5	34,5	212 000
1	1,95				
		21	63	42	220 000
	Moyenne :	21	63	42	220 000
6	2				
		8	46	30	185 000
		20	59	40,5	287 000
	Moyenne :	15,5	51,5	35,5	233 000
12	2,1				
		8,5	51	35	210 000
		23	61	49,5	300 000
	Moyenne :	15	55,5	40,5	261 000
2	2,15				
		20	47	27	200 000
		22,5	52	30,5	270 000
	Moyenne :	21	49,5	28,5	235 000
10	2,2				
		12	49	32	196 000
		27,5	63	43	330 000
	Moyenne :	18,5	55	36,5	247 000
2	2,25				
		8	55	47	170 000
		19,5	47	27,5	200 000
	Moyenne :	13,5	51	37,5	185 000
12	2,3				
		12	46,5	25	150 000
		28	57	43	285 000
	Moyenne :	19	52	33	227 000

Nombre de cas	Fibrinogène g/l.	Am2	Am1	Ap	Plaquettes/mm3
5	2,35				
	Valeurs	11,5	46	25,5	190 000
	extrêmes	20,5	56	44,5	245 000
	Moyenne :	16	49	35	195 000
12	2,4	14	50	31	150 000
		22	59	43	260 000
	Moyenne :	17	53	36	217 000
6	2,45				
		11,5	46	28	250 000
		23	58	43,5	294 000
	Moyenne :	16	50,5	34,5	272 000
11	2,5				
		11	46	25	160 000
		22	64	45	250 000
	Moyenne :	18	54,5	36,5	223 000
3	2,55				
		11,5	52	33	180 000
		20,5	58	42,5	280 000
	Moyenne :	17	54,5	37,5	233 000
26	2,6				
		12	46	27,5	170 000
		25,5	61	45,5	300 000
	Moyenne :	17,5	53	35,5	233 000
5	2,65				
		16	46	30	180 000
		19	60	43	300 000
	Moyenne :	17	53,5	36,5	226 000
7	2,7				
		15	46	24,5	225 000
		22	60	44	300 000
	Moyenne :	19,5	54	34,5	254 000
8	2,75				
		12	50	35	208 000
		26	62	43	272 000
	Moyenne :	17	55	38	241 000
27	2,8				
		14,5	51	29,5	175 000
		24,5	65	48,5	318 000
	Moyenne :	18,5	56,5	38	249 000

Nombre de cas	Fibrinogène g/l.	Am2	Am1	Ap	Plaquettes/mm ³
6	2,85				
	Valeurs	12,5	46	28	155 000
	extrêmes	26	63	47	282 000
	Moyenne :	17	53	36	227 000
32	2,9				
		12	47	28	155 000
		27	62,5	47,5	320 000
	Moyenne :	18,5	54,5	36	244 000
6	2,95				
		15	49,5	28,5	205 000
		21	59	44	308 000
	Moyenne :	19	53,5	34,5	268 000
35	3				
		14	46	22	160 000
		29	65	48	312 000
	Moyenne :	19,5	54,5	35	229 000
14	3,1				
		15	51	32	153 000
		30	64,5	41	290 000
	Moyenne :	20,5	56,5	36	229 000
2	3,15				
		19,5	63,5	44	302 000
		23	52	29	115 000
	Moyenne :	21	57,5	36,5	208 000
15	3,2				
		14	46	24,5	120 000
		26	62	44	300 000
	Moyenne :	21	54,5	33,5	226 000
6	3,25				
		16	57	30,5	170 000
		24	61	45	304 000
	Moyenne :	20	58	38	250 000
15	3,3				
		17	50	28,5	130 000
		25	66	43,5	290 000
	Moyenne :	20,5	55,5	35	229 000

Nombre de cas	Fibrinogène g/l.	Am2	Am1	Ap	Plaquettes/mm ³
1	3,35	20	55	35	305 000
	Moyenne :	20	55	35	305 000
15	3,4	18	46	24	195 000
		29	64	42	280 000
	Moyenne :	22,5	56	33,5	245 000
25	3,5	15	47	23	175 000
		33	65	45	330 000
	Moyenne :	22,5	56	33,5	240 000
3	3,55	20	53	31	200 000
		27	61	34	256 000
	Moyenne :	23	56	33	222 000
5	3,6	18	47	26	180 000
		24	63	44	287 000
	Moyenne :	20,5	54,5	34	225 000
3	3,65	21	51	27	225 000
		25	59	36	282 000
	Moyenne :	23	54	31	250 000
13	3,7	21	49	23	170 000
		30	64	38	298 000
	Moyenne :	25	57	32	247 000
5	3,75	22	52	27	220 000
		25	59	36	310 000
	Moyenne :	23	57	34	264 000
14	3,8	12	50	20	180 000
		30	65	45	290 000
	Moyenne :	23,5	56	32,5	235 000
2	3,85	21	51	30	185 000
		26,5	53	26,5	175 000
	Moyenne :	23,5	52	28,5	180 000

Nombre de cas	Fibrinogène g/l	Am2	Am1	Ap	Plaquettes/mm3
5	3,9				
	Valeurs	21	45	24	275 000
	extrêmes	30	62	36	327 000
	Moyenne :	24	53,5	29,5	297 000
37	4				
		17	50	19	160 000
		34,5	65,5	44	336 000
	Moyenne :	25	58,5	33,5	249 000
10	4,4				
		25	45	20	205 000
		30	65	36	350 000
	Moyenne :	27	57,5	30,5	264 000
1	4,15				
		30	63	33	279 000
	Moyenne :	30	63	33	279 000
25	4,2				
		14	50	26	160 000
		32	66	42	325 000
	Moyenne :	24	58,5	34,5	239 000
4	4,25				
		27	58	31	215 000
		29	62	33	278 000
	Moyenne :	28	60	32,5	292 000
11	4,3				
		23	46	21	150 000
		31	68	38,5	310 000
	Moyenne :	26	59	33	244 000
1	4,35				
		26	63	37	204 000
	Moyenne :	26	63	37	204 000
10	4,4				
		20	54	27	152 000
		32	66	43	302 000
	Moyenne :	26	60	34	249 000
3	4,45				
		24	52	25	223 000
		27	55	31	300 000
	Moyenne :	25,5	53	27,5	273 000

Nombre de cas	Fibrinogène g/l.	Am2	Am1	Ap	Plaquettes/mm3
18	4,5				
	Valeurs	21	46	24	188 000
	extrêmes	31	67	46	316 000
	Moyenne :	26	59	33	246 000

TABLEAU N° 10

VARIATIONS DE Am2 EN FONCTION DU TAUX DE FIBRINOGENE

chez 300 sujets hyperfibrinémiques

Nombre de cas	Fibrinogène g/l.	Am2	Am1	Ap	Plaquettes/mm3
18	4,6				
	Valeurs	20	45	25	90 000
	extrêmes	33	66	39	305 000
	Moyenne :	25,5	59	33,5	227 000
10	4,7				
		21	54	24	202 000
		35	68	44	283 000
	Moyenne :	28,5	63	34,5	252 000
9	4,8				
		18	37	13	75 000
		33	64	42	307 000
	Moyenne :	26,5	52,5	26	219 000
2	4,85				
		32	61	29	243 000
		32	62	30	408 000
	Moyenne :	32	61,5	29,5	325 000
7	4,9				
		21,5	47	12	100 000
		38	72	41	330 000
	Moyenne :	30	61	31	229 000
18	5				
		23,5	47	18	102 000
		38	69	39	339 000
	Moyenne :	29	59,5	30,5	245 000
11	5,1				
		24	41	16	55 000
		35	70	44	318 000
	Moyenne :	27,5	61	33,5	252 000
5	5,2				
		31	46	12	248 000
		35	69	35	428 000
	Moyenne :	32,5	60	27,5	304 000
3	5,25				
		6	58	21	210 000
		40	68	62	250 000
	Moyenne :	26,5	62	35,5	231 000

Nombre de cas	Fibrinogène g/l.	Am2	Am1	Ap	Plaquettes/mm3
14	5,3				
	Valeurs	25	44	14	83 000
	extrêmes	35	77	47	320 000
	Moyenne :	30	62	32	254 000
11	5,4				
		21	59	26	150 000
		34	70	46	380 000
	Moyenne :	28,5	64	35,5	246 000
11	5,5				
		26	55	18	168 000
		37	70	42	355 000
	Moyenne :	31	62	31	246 000
12	5,6				
		25	50	15	188 000
		41	68	38	340 000
	Moyenne :	33	61,5	29,5	257 000
5	5,7				
		23	41	12	210 000
		34	65	36	302 000
	Moyenne :	30	57,5	27,5	252 000
4	5,75				
		30	59	26	190 000
		34	65	35	283 000
	Moyenne :	32	63	31	252 000
8	5,8				
		26	50	20,5	175 000
		37	76	48	310 000
	Moyenne :	32	66	34	232 000
6	5,9				
		16,5	53	23	180 000
		38	72,5	56	310 000
	Moyenne :	30,5	66,5	36	269 000
7	6				
		22	56	21	180 000
		41	77	44	347 000
	Moyenne :	32,5	66	33,5	257 000
5	6,1				
		27	54	18	180 000
		44	74	41	330 000
	Moyenne :	35	62,5	29,5	249 000

Nombre de cas	Fibrinogène g/l.	Am2	Am1	Ap	Plaquettes/mm ³
6	6,2				
	Valeurs	20	56	28	225 000
	extrêmes	38	71	40	402 000
	Moyenne :	29	62,5	32,5	285 000
3	6,25				
		31	50	19	240 000
		34	71	38	265 000
	Moyenne :	32,5	60	27,5	256 000
5	6,3				
		36	57	21	220 000
		43	69	32	325 000
	Moyenne :	39	65,5	26,5	278 000
4	6,35				
		32	56,5	22,5	90 000
		41	73	41	312 000
	Moyenne :	35,5	63	27,5	223 000
11	6,4				
		27	56	25	223 000
		45	79	42	340 000
	Moyenne :	33	65,5	32,5	279 000
5	6,5				
		26	48	18	180 000
		40	72	42	424 000
	Moyenne :	31,5	62	30,5	256 000
6	6,6				
		28	59	25	197 000
		43	70	40	312 000
	Moyenne :	34	65,5	31,5	256 000
3	6,7				
		33	53	15	70 000
		38	70	37	240 000
	Moyenne :	35	63,5	28,5	171 000
7	6,8				
		28	60	30	208 000
		42	76,5	35	357 000
	Moyenne :	39	66	27	267 000
6	6,9				
		35	60	16,5	70 000
		49	77	40	340 000
	Moyenne :	40	66	26	242 000

Nombre de cas	Fibrinogène g/l.	Am2	Am1	Ap	Plaquettes/mm3
4	7				
	Valeurs extrêmes	36 45	61 70,5	21 27,5	140 000 310 000
	Moyenne :	41,5	65	23,5	256 000
2	7,1				
		37 41	70 71	29 34	230 000 240 000
	Moyenne :	39	70,5	31,5	235 000
4	7,2				
		36 46	52 74	12 32	150 000 350 000
	Moyenne :	31	66,5	35,5	260 000
2	7,3				
		40 41	67 70	26 30	280 000 320 000
	Moyenne :	40,5	68,5	28	300 000
2	7,4				
		32 41	64 65	23 33	120 000 294 000
	Moyenne :	36,5	64,5	28	207 000
3	7,5				
		33 41	56 61	15 28	180 000 210 000
	Moyenne :	37	59	22	197 000
3	7,6				
		36 41	61 76	21 40	200 000 300 000
	Moyenne :	39	67	28	255 000
2	7,8				
		33 40	55 60	20 22	200 000 272 000
	Moyenne :	36,5	57,5	21	236 000
4	7,9				
		33 44	65 70	26 33	210 000 310 000
	Moyenne :	38,5	68	19,5	262 000
5	8				
		33 42	62 69	21 34	230 000 316 000
	Moyenne :	37,5	66	28,5	273 000

Nombre de cas	Fibrinogène g/l.	Am2	Am1	Ap	Plaquettes/mm3
5	8,3				
	Valeurs extrêmes	38 49	62 76	17 30	232 000 390 000
	Moyenne :	42,5	68	25,5	288 000
5	8,4				
		31 43	48 72	16 33	108 000 285 000
	Moyenne :	37	62,5	25,5	225 000
3	8,5				
		35 54	63 74	20 28	310 000 373 000
	Moyenne :	43,5	68	24,5	332 000
3	8,7				
		42 49	69 74	21 32	310 000 315 000
	Moyenne :	46	71	25	312 000
3	8,8				
		43 49	70 73,5	24 27,5	247 000 330 000
	Moyenne :	46	72	26	299 000
3	8,9				
		35 48	67 70	19 35	290 000 327 000
	Moyenne :	40	68	28	307 000
4	9				
		32 46	60 74	24 31	200 000 320 000
	Moyenne :	38,5	66,5	28	267 000
4	9,1				
		36 45	66 72	21 37	208 000 298 000
	Moyenne :	39	68,5	29,5	248 000
2	9,3				
		41 52	69 80	28 29	192 000 277 000
	Moyenne :	46,5	74,5	28,5	234 000
2	9,4				
		50 52	70 75	18 25	235 000 300 000
	Moyenne :	51	72,5	21,5	267 000

Nombre de cas	Fibrinogène g/l.	Am2	Am1	Ap	Plaquettes/mm ³
4	9,5				
	Valeurs	41	68	20	171 000
	extrêmes	55	78	37	360 000
	Moyenne :	47	74	27	258 000
3	9,7				
		43	56	13	232 000
		48	73	28	246 000
	Moyenne :	45	67	22	240 000
7	10				
		43	64	14	200 000
		55	79	29	400 000
	Moyenne :	48	71,5	23,5	297 000
1	11				
		49	69	20	280 000
	Moyenne :	49	69	20	280 000
1	11,8				
		49	72	23	250 000
	Moyenne :	49	72	23	250 000
1	14				
		57	74	17	276 000
	Moyenne :	57	74	17	276 000

TABLEAU N° 11

VARIATIONS DU TAUX DE FIBRINOGENE EN FONCTION DE Am₂ -

chez 300 sujets hyperfibrinémiques

Nombre de cas	Am ₂	Fibrinogène g/l	Am ₁	Ap	Plaquettes/mm ³
1	6				
	Valeurs extrêmes	5,25	68	62	250 000
	Moyenne :	5,25	68	62	250 000
1	16,5				
		5,9	72,5	56	298 000
	Moyenne :	5,9	72,5	56	298 000
1	18				
		4,8	60	42	270 000
	Moyenne :	4,8	60	42	270 000
3	20				
		4,6	45	25	90 000
		6,2	60	40	260 000
	Moyenne :	5,1	55	35	201 000
2	21				
		4,7	65	44	282 000
		5,4	67	46	322 000
	Moyenne :	4,55	66	45	302 000
1	21,5				
		4,9	58	36,5	330 000
	Moyenne :	4,9	58	36,5	330 000
2	22				
		4,8	43	21	220 000
		6	66	44	302 000
	Moyenne :	5,4	54,5	32,5	281 000
2	23				
		5	59	36	250 000
		5,7	61	37,5	275 000
	Moyenne :	5,35	60	36,5	262 000
6	24				
		4,6	37	13	75 000
		5,1	68	44	265 000
	Moyenne :	4,7	55,5	31,5	210 000

Nombre de cas	Am2	Fibrinogène g/l	Am1	Ap	Plaquettes/mm ³
14	25				
		Valeurs	41	16	83 000
		extrêmes	67	42	305 000
		Moyenne :	59	34	216 000
13	26				
		4,6	54	28	211 000
		6,5	74	44	280 000
		Moyenne :	62	36	237 000
8	27				
		4,6	55	28	170 000
		6,4	67	40	307 000
		Moyenne :	62,5	35,5	255 000
14	28				
		4,6	39	11	187 000
		6,8	70	42	327 000
		Moyenne :	61,5	33	240 000
16	29				
		4,6	47	12	102 000
		6,8	73	44	310 000
		Moyenne :	59	30	258 000
23	30				
		4,6	44	14	168 000
		6,8	77	47	320 000
		Moyenne :	65	35	254 000
17	31				
		4,7	48	17	175 000
		8,4	71	39	330 000
		Moyenne :	61	30	241 000
22	32				
		4,85	57	25	120 000
		9	73	41	408 000
		Moyenne :	62,5	30,5	268 000
23	33				
		4,6	55	17	190 000
		8,4	74	41	310 000
		Moyenne :	63,5	30,5	244 000
10	34				
		5,2	46	12	90 000
		6,6	67	33	380 000
		Moyenne :	60,5	26,5	231 000

Nombre de cas	Am2	Fibrinogène g/l.	Am1	Ap	Plaquettes/mm3
19	35				
	Valeurs	4,7	47	12	100 000
	extrêmes	8,5	76	41	428 000
	Moyenne :	6,15	66	31	270 000
8	36				
		6,3	57	21	140 000
		9,1	76	40	300 000
	Moyenne :	7,55	66	30	240 000
12	37				
		5,5	55	18	180 000
		7,5	77	40	327 000
	Moyenne :	6,4	67,5	30,5	251 000
10	38				
		4,9	53	15	70 000
		8,9	72	34	402 000
	Moyenne :	6,6	66,5	28,5	271 000
2	39				
		6,9	61	22	70 000
		8,4	72	33	230 000
	Moyenne :	7,6	66,5	27,5	150 000
8	40				
		5,25	52	12	150 000
		9,1	70	30	280 000
	Moyenne :	7,35	63,5	23,5	232 000
14	41				
		6	56	15	200 000
		9,5	78	37	360 000
	Moyenne :	7,65	66,5	25,5	271 000
7	42				
		5,6	57	15	282 000
		8,7	76,5	34,5	357 000
	Moyenne :	7,25	67,5	25,5	319 000
10	43				
		6	56	13	200 000
		10	74	31	350 000
	Moyenne :	7,7	66	23	267 000
4	44				
		5,6	62	18	232 000
		9,7	72	28	303 000
	Moyenne :	6,8	66	22	268 000

Nombre de cas	Am2	Fibrinogène g/l.	Am1	Ap	Plaquettes/mm ³
6	45				
	Valeurs extrêmes	6,4 10	62 79	17 34	200 000 330 000
	Moyenne :	8,3	69,5	24,5	267 000
4	46				
		7,2 9,5	68 73,5	22 27,5	250 000 330 000
	Moyenne :	8,6	70,5	24,5	286 000
2	47				
		8,7 9,5	69 74	22 27	171 000 310 000
	Moyenne :	9,1	71	24	240 000
4	48				
		8,9 10	67 75	19 27	242 000 390 000
	Moyenne :	9,65	72	24	300 000
6	49				
		6,9 11,8	67 76	18 27	250 000 390 000
	Moyenne :	9,25	71	22	300 000
3	50				
		9,4 10	64 79	14 29	250 000 300 000
	Moyenne :	9,8	72,5	22,5	281 000
2	52				
		9,3 9,4	70 80	18 28	192 000 235 000
	Moyenne :	9,35	75	23	213 000
1	54				
		8,5	74	20	373 000
	Moyenne :	8,5	74	20	373 000
2	55				
		9,5 10	72 76	17 20	325 000 400 000
	Moyenne :	9,75	74	19	362 000
1	57				
		14	74	17	270 000
	Moyenne :	14	74	17	270 000

ACTION DU SÉRUM SUR L'AMPLITUDE MAXIMA DU PDP

L'augmentation en clinique de l'amplitude du PDP dans les syndromes inflammatoires avec augmentation des muco-protéines (α_1 et α_2 globulines) et le manque de concordance statistique entre le taux du fibrinogène et la valeur de Am_2 prouvent qu'il existe certainement au moins une autre variable sérique de l'amplitude maxima.

Ceci nous a amené à étudier l'action du sérum sur l'amplitude maxima des diagrammes de coagulation du fibrinogène purifié.

TECHNIQUE -

Nous avons fait plusieurs types d'expériences :

Expérience témoin : caractère de la fraction I substrat.

Nous utilisons un système purifié préparé avec une fraction I de plasma humain purifié coagulée par la thrombine (cette fraction I contenait 50 p. 100 de protéines dont 97 p. 100 de protéines coagulables). Le caillot ainsi obtenu est presque entièrement soluble dans l'urée 5 M. La fraction I utilisée est donc pratiquement dépourvue de facteur de stabilisation de la fibrine.

10 mg de cette fraction sont dissous dans 1 ml de tampon véronal-acétate à pH 7,35. On met 0,25 ml de cette préparation dans la cuve de l'appareil puis on lui ajoute 0,05 ml d'une solution de thrombine au 1/50 (ampoules de thrombase Roussel dont la poudre est diluée dans 5 ml d'eau distillée, cette solution étant ensuite rediluée au 1/50).

On enregistre alors le diagramme : son amplitude est habituellement voisine de 8 mm.

- Action du sérum sur la fraction I substrat en l'absence de Cl_2Ca .

Le sérum de sujets normaux est obtenu après incubation du sang en présence de son caillot pendant 4 h. à 37° pour le débarrasser de toute trace de thrombine. On vérifie l'absence de thrombine en mélangeant le sérum à du plasma normal citraté. On décalcifie alors le sérum par une solution de citrate de sodium à la concentration utilisée habituellement pour le plasma.

La même quantité de fraction I purifiée que dans l'expérience-témoin est dissoute dans du sérum pur ou ses dilutions progressives en tampon véronal-acétate à pH 7,35.

- Action du sérum sur la fraction I substrat en présence de Cl_2Ca .

Les expériences sont pratiquement identiques aux précédentes mais le système purifié est coagulé par 0,05 ml de thrombine et 0,10 ml de Cl_2Ca à la concentration habituellement utilisée en thrombodynamographie.

- Action du sérum préalablement chauffé à 56° pendant une demi-heure, ou adsorbé sur SO_4Ba sur la fraction I substrat en présence et en l'absence de Cl_2Ca .

On enregistre le TDG de ces mixtures comparativement au TDG du mélange "fraction I témoin + thrombine".

RESULTATS -

a) Action du sérum brut sur la fraction I substrat en l'absence de Cl_2Ca .

Six expériences de ce type ont toutes donné des résultats identiques (Fig. XXXIX).

En l'absence de Cl_2Ca le sérum diminue l'amplitude des diagrammes obtenus avec la fraction I substrat coagulée par la thrombine, proportionnellement à sa concentration. L'amplitude maxima se réduit finalement à 1 ou 2 mm mais ne s'annule pas.

Par contre la constante r reste inchangée ce qui prouve que le sérum n'intervient pas comme une antithrombine.

b) Action du sérum brut sur la fraction I substrat en présence de Cl_2Ca
(Fig. XL).

Dix expériences nous ont permis de tracer une courbe moyenne des variations de l'amplitude en fonction de la quantité de sérum (Fig. XLI).

Quand la fraction I est dissoute dans un mélange sérum - tampon, le caillot obtenu devient insoluble dans l'urée 5 M. Le sérum apporte donc le facteur de stabilisation de la fibrine dont la fraction I utilisée était presque totalement dépourvue.

On observe, en outre, deux catégories de phénomènes :

- L'adjonction de sérum en quantité croissante provoque d'abord une augmentation progressive de l'amplitude maxima, contrairement à ce qui se passe dans

les expériences précédentes. Cette amplitude double ou même triple pour des dilutions de sérum au 1/5 ou au 1/3 en tampon véronal-acétate à pH 7,35.

- mais au-delà, lorsqu'on augmente encore les proportions de sérum (à partir d'une dilution au 1/2) on observe au contraire une diminution progressive de l'amplitude maxima en fonction de la quantité de sérum. Finalement, lorsque le fibrinogène est dilué en sérum pur l'amplitude maxima est très réduite (voisine de 2 à 3 mm).

- De toute façon les valeurs de la constante r se modifient peu.

c) Action du sérum chauffé une demi-heure à 56° ou adsorbé sur SO_4Ba sur la fraction I substrat.

Douze expériences en présence de Cl_2Ca et douze en l'absence de Cl_2Ca ont donné des résultats identiques à ceux obtenus avec le sérum brut, ce qui prouve que les activités mises en évidence dans le sérum sont thermostables et non adsorbables sur SO_4Ba .

DISCUSSION -

Ces expériences étudiant l'action du sérum normal sur la coagulation du fibrinogène purifié pratiquement exempt de facteur de stabilisation de la fibrine mettent en évidence deux activités antagonistes du sérum normal.

a) En présence de Cl_2Ca le sérum normal rend insoluble dans l'urée les caillots obtenus par l'action de la thrombine sur du fibrinogène purifié. Il apporte donc le facteur de stabilisation de la fibrine qui manquait à ce fibrinogène.

Cet apport spécifique de facteur de stabilisation de la fibrine se traduit dans les mêmes conditions d'étude par une augmentation progressive de l'amplitude maxima des diagrammes de coagulation du fibrinogène purifié en présence de thrombine. Ceci démontre l'influence du facteur de stabilisation de la fibrine sur l'amplitude maxima du PDP et confirme les expériences décrites par M. E. Leroux en 1957 (49).

b) Il apparaît par ailleurs un fait entièrement inédit : l'existence d'un inhibiteur sérique de la structuration du caillot. En effet en l'absence de calcium

le sérum normal diminue l'amplitude maxima des diagrammes de coagulation par la thrombine du fibrinogène purifié exempt de facteur de stabilisation de la fibrine.

Cette diminution d'amplitude est proportionnelle à la quantité de sérum mise en expérience.

En présence de Cl_2Ca les faibles quantités de sérum ont bien une activité du type facteur de stabilisation de la fibrine mais une activité antagoniste apparaît quand le sérum est apporté en fortes quantités dans l'expérience.

Les résultats obtenus en présence et en l'absence de Cl_2Ca sont identiques quand les sérums expérimentés ont été adsorbés sur SO_4Ba ou chauffés une demi-heure à 56° . Les deux facteurs sériques antagonistes de la structuration du caillot sont donc thermostables et non adsorbables sur SO_4Ba .

- CONCLUSIONS -

Par cette série d'expériences :

- Nous avons confirmé l'intervention d'un facteur thermostable et non adsorbable du sérum : le facteur de stabilisation de la fibrine dans la structuration du caillot et dans l'amplitude maxima du PDP. Ce facteur qui rend le caillot insoluble dans l'urée 3 M n'est actif qu'en présence de Cl_2Ca .

- Nous avons découvert l'existence d'un inhibiteur sérique thermostable et non adsorbable de la structuration du caillot. Ce facteur est actif sans le concours du calcium. Il tend pour son propre compte à diminuer l'amplitude maxima des diagrammes de coagulation par la thrombine d'une solution de fibrinogène purifié. On peut donc en inférer qu'il tend aussi à diminuer l'amplitude maxima du PDP.



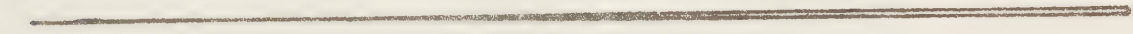
1



2



3



4

Fig. XXXIX

Action du sérum sur l'amplitude d'un système purifié en l'absence de calcium -

de	1 système purifié
haut en	2 avec 0,05 ml de sérum
bas	3 avec 0,10 ml de sérum
	4 avec 0,20 ml de sérum

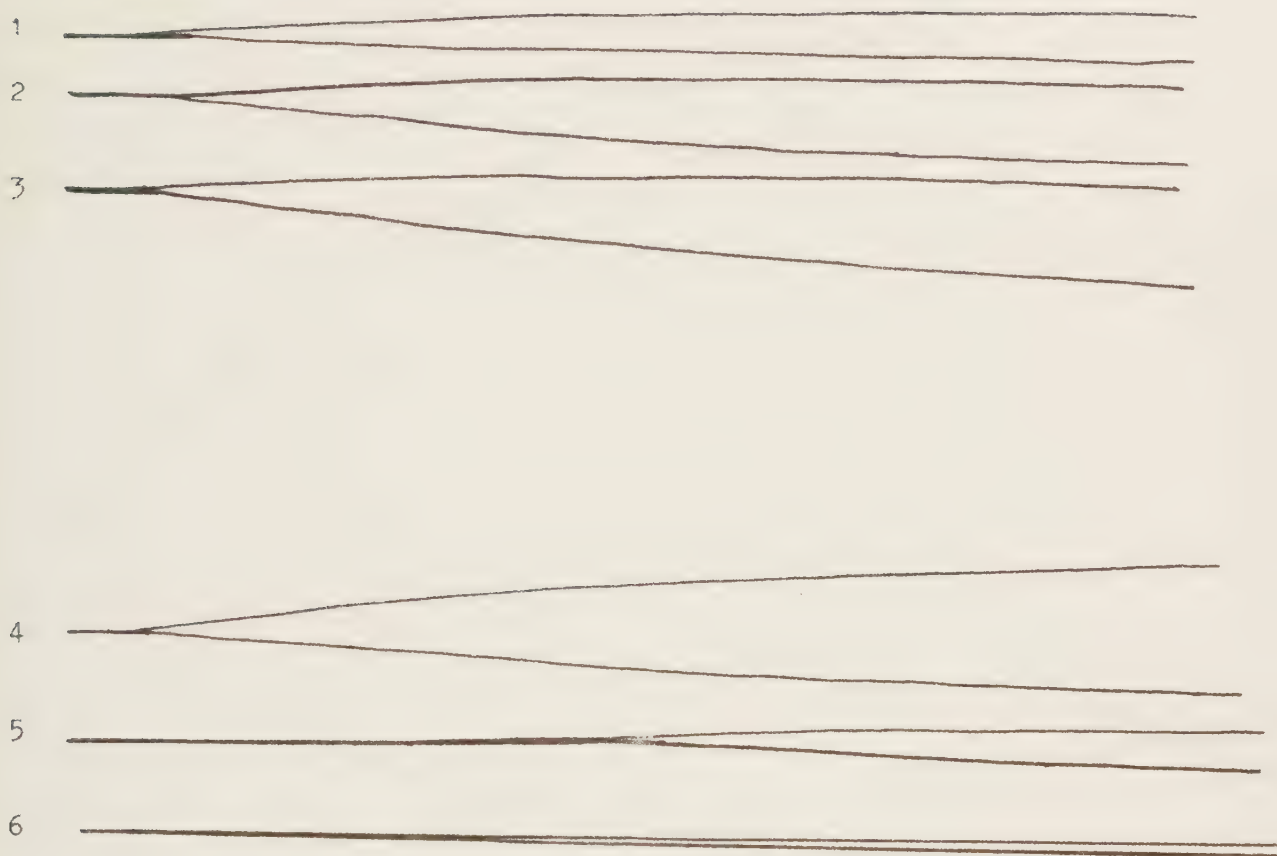


Fig. XL

Mêmes diagrammes après adjonction de calcium

- 1 système purifié
- 2 avec 0,05 ml de sérum
- 3 avec 0,10 ml de sérum
- 4 avec 0,25 ml de sérum
- 5 avec 0,50 ml de sérum
- 6 sérum pur

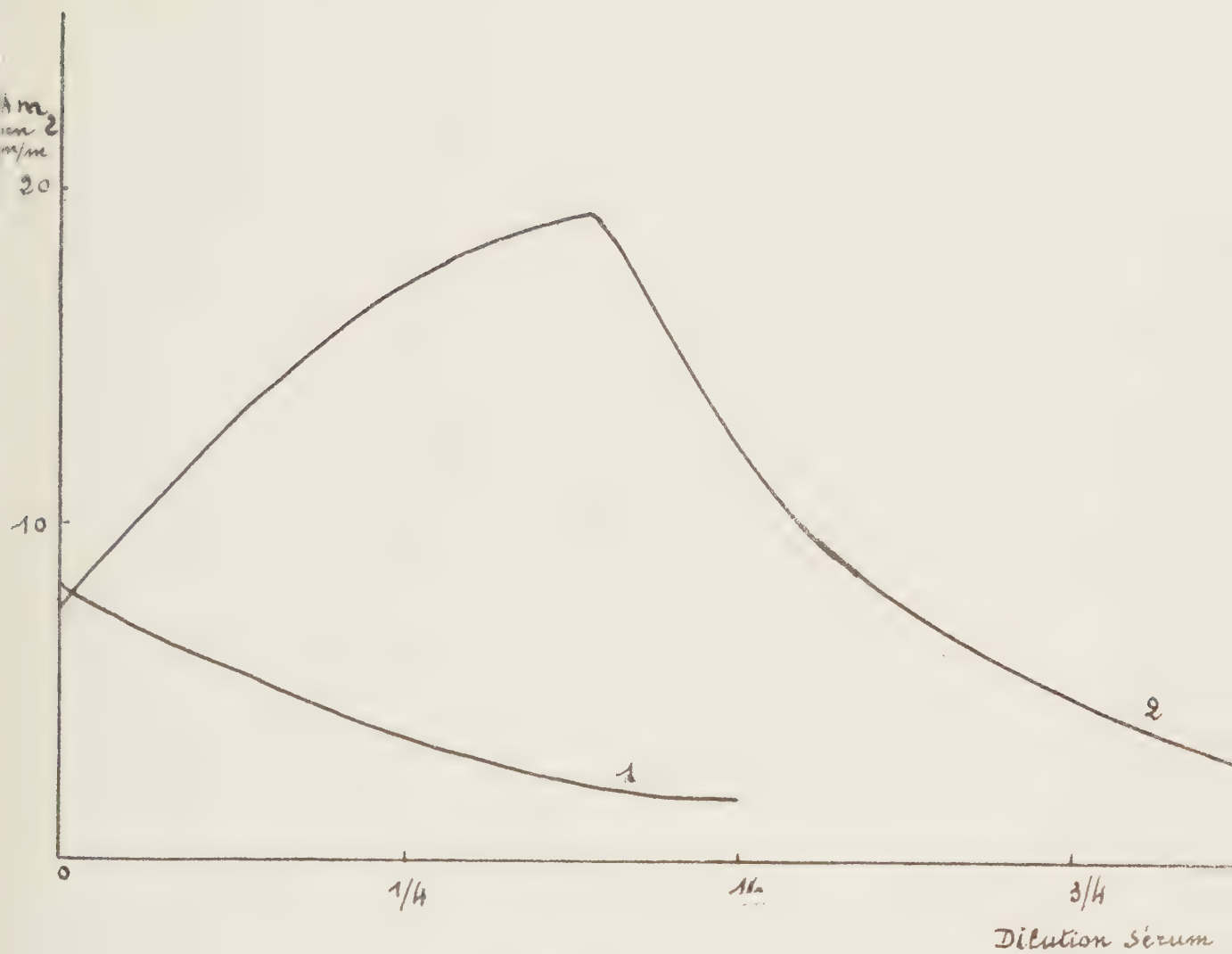


Fig. XLI

Action du sérum sur l'amplitude du PDP

1 - en l'absence de calcium

2 - en présence de calcium

C H A P I T R E X I I
* * * *

ETUDE DE L'ACTION DE QUELQUES PROTEINES SERIQUES SUR L'AMPLITUDE MAXIMA DU P R P ET DU P D P

Après avoir confirmé l'action du facteur de stabilisation de la fibrine et découvert l'existence d'un inhibiteur sérique de la structuration du caillot, nous nous sommes proposé d'étudier l'action de quelques fractions protéiques purifiées sur l'amplitude maxima des diagrammes de PRP et de PDP.

TECHNIQUE -

- Nous avons utilisé les mêmes fractions protéiques que celles qui nous ont servi dans les expériences d'incubation des plaquettes rapportées au chapitre VI : fraction II de Cohn (γ -globuline), fraction V de Cohn (sérum - albumine), haptoglobine, céruloplasmine. Nous avons, en outre, essayé l'orosomucoïde qui nous a été aimablement fourni par le Professeur Biserte qui le prépare selon la technique qu'il a décrite (3).

- Nous avons étudié l'influence de ces différentes fractions

sur le PRP : ces expériences complètent celles que nous avons faites sur l'incubation de plaquettes.

sur le PDP et sur la fraction I purifiée coagulée par la thrombine.

Nous avons, dans tous les cas, utilisé des solutions de ces fractions nous permettant d'obtenir des concentrations allant de 1 à 10 fois la concentration physiologique.

Vingt cinq expériences de chaque type ont été faites avec chacune des fractions utilisées.

On compare chaque fois les diagrammes obtenus avec ceux du même plasma (PRP ou PDP) traité dans les mêmes conditions de dilution mais dépourvu de la fraction protéique à étudier.

RESULTATS -

- Sur le diagramme de PRP :

. Les γ -globulines et l'haptoglobine ne provoquent pas de modifications des diagrammes lorsqu'on les emploie à des concentrations allant de 1 à 5 fois la concentration physiologique. Aux plus fortes concentrations on note dans certains cas l'apparition d'images d'hyperrétractilité : images en "goulot".

. La céruloplasmine augmente légèrement (quelques millimètres) l'amplitude maxima du PRP pour des concentrations allant de 1 à 5 fois la concentration physiologique puis elle détermine de façon constante des hyperrétractilités.

. La sérum-albumine provoque dans à peine la moitié des cas (10 expériences sur 25) une minime augmentation de l'amplitude du PRP lorsqu'on utilise des concentrations de sérum-albumine de 5 à 25 mg par millilitre de plasma. Au-delà de cette concentration on observe soit un allongement de plus en plus important des r et k et une diminution d'amplitude maxima, soit au contraire l'apparition d'images en "goulot".

- Sur les diagrammes de PDP :

Ni la sérum-albumine ni les γ -globulines ni l'haptoglobine ni l'orosomucoïde ne modifient l'amplitude maxima des diagrammes à quelque concentration qu'on les utilise.

La céruloplasmine provoque dans la moitié des cas une légère augmentation de l'amplitude maxima du PDP.

L'action de la céruloplasmine paraît plus constante sur l'amplitude des diagrammes obtenus avec la fraction I purifiée coagulée par la thrombine.

- CONCLUSIONS -

Cette série d'expériences ne nous permet pas de confirmer les travaux antérieurs de Sokal (95) qui avait assigné à la sérum-albumine un rôle indispensable dans la fonction de structuration des plaquettes et dans la rétraction du caillot. En effet, la fraction V purifiée de plasma humain que nous avons étudiée n'augmente pas sensiblement l'amplitude maxima et ne devient hyperrétractante

que pour des concentrations non réalisées in vivo. Rappelons que les expériences d'incubation des plaquettes dans la fraction V ont également donné des résultats négatifs.

A fortes concentrations sans rapport avec celles rencontrées in vivo toutes les protéines étudiées sont hyperrétractantes. Mais les expériences d'incubation des plaquettes dans ces protéines n'avaient pas montré d'action spécifique sur la fonction thrombodynamique. Cette hyperrétractilité est donc probablement non spécifique.

Une seule de ces protéines, la céruloplasmine, manifeste une activité spécifique à des concentrations susceptibles d'être rencontrées in vivo. Les modifications qu'elle imprime au PRP (augmentation de l'amplitude maxima et hyperrétraction) concordent avec les résultats de nos expériences d'incubation des plaquettes décrites au chapitre VI : tout comme le facteur XII activé, la céruloplasmine est capable d'activer les plaquettes et d'induire leur métamorphose visqueuse. D'autre part, la céruloplasmine se comporte comme l'un des facteurs qui conditionne l'amplitude maxima du PDP : son action étant positive comme celle du fibrinogène et du facteur de stabilisation de la fibrine.

Rappelons que la céruloplasmine est une diphénoloxydase et qu'à ce titre elle pourrait peut-être intervenir comme catalyseur dans la chaîne des réactions d'oxydo-réduction par lesquelles s'opère le transport de disulfures dont est responsable le facteur de stabilisation de la fibrine.

C H A P I T R E XIII

* * *

EXEMPLES D'APPLICATION DES RECHERCHES PRECEDENTES
EN . PHARMACODYNAMIE :

Recherches sur l'action éventuelle de trois agents
thérapeutiques sur les plaquettes

=====

I - CYCLONAMINE -

Estève, Laporte et Règne (1) ont étudié l'activité antihémorragique de la cyclonamine, produit de la famille du naphthionate de sodium (qui est un hémocstatique bien connu).

Ce nouveau dérivé aurait une action antihémorragique plus importante, raccourcissant le temps de saignement et le temps de coagulation, tandis que sa toxicité serait moindre.

Il nous a été demandé de rechercher si ce produit avait ou non une action sur les fonctions des plaquettes.

Nous avons étudié l'action de ce produit sur les plaquettes en procédant à deux catégories d'essais :

a) Adjonction du produit à concentrations progressivement croissantes à un PRP (30 essais)

b) Incubation des plaquettes dans des solutions de ce produit (25 essais)

a) La solution-mère qui correspond à 125 mg de produit par ml a été rediluée en eau physiologique de façon à obtenir dans le plasma des concentrations allant de 1,25 à 125 mg pour 10 cc de plasma. Les diagrammes obtenus sont comparés avec ceux d'un même plasma traité dans les mêmes conditions de dilution mais dépourvu de cyclonamine.

Aux très fortes concentrations (1/10 à 1/80) on obtient un très net effet anticoagulant (la valeur de r et k double et même triple) et un effet dépresseur sur les plaquettes (diminution de A_m et A_p).

Au-delà d'une concentration au 1/100 on n'observe plus aucun effet de la cyclonamine ni sur les constantes r et k ni sur l'amplitude maxima.

b) Les expériences d'incubation sont comparables à celles que nous avons déjà décrites. Les plaquettes séparées à partir du plasma recueilli sur EDTA sont incubées pendant une demi-heure à 18 ou à 37° dans des solutions de naphthionamine dont les concentrations varient de 1/500 à 1/2000. Elles sont ensuite remises en solutions dans du PDP et les diagrammes obtenus sont comparés à ceux du PDP re-plaqueté avec des plaquettes incubées en tampon véronal-acétate à pH 7,35.

Nous n'avons observé aucune modification des diagrammes.

Conclusions

Aux concentrations utilisées en thérapeutique on voit donc que la naphthionamine ne modifie pas directement les diagrammes de PRP et n'a aucune action positive ou négative sur la fonction thrombodynamique des plaquettes isolées. Ces résultats démontrent que cet hémostatique qui raccourcit expérimentalement le temps de saignement et le temps de coagulation du lapin agit par un mécanisme où les plaquettes ne sont probablement pas en cause.

II - SURGICEL (hemostatic absorbable packing strip) -

Il s'agit d'une ingénieuse compresse résorbable en cellulose dont l'action hémostatique locale peut être démontrée expérimentalement chez l'animal et s'avère très intéressante en clinique notamment en chirurgie (2 - 3).

Il nous a été demandé de rechercher si les plaquettes intervenaient dans ce pouvoir hémostatique.

Dans nos expériences nous introduisons un carré de 1 cm de côté de la compresse hémostatique à étudier dans un volume de 10 ml de sang citraté ou de plasma citraté riche en plaquettes ou déplaqueté recueilli en matériel siliconé.

Avant et après contact, on enregistre un diagramme de PRP et de PDP. A titre de contrôle on traite un échantillon similaire du même sang par un carré de 1 cm de côté d'une compresse de coton type AP et on examine un second échantillon du même sang sans contact préalable avec aucun corps étranger.

Dans les quinze essais on note dans les plasmas ayant subi le contact de la compresse un raccourcissement net des constantes r et k , particuliè-

restent net dans le plasma déplaqueté et quand on utilise des plasmas hypocoagulables.

La dissolution de la compresse est complète en 24 heures environ. Le plasma ou l'eau physiologique qui ont servi à la dissoudre présentent aussi un effet coagulant objectivable quand on les ajoute à un PRP ou à un PDP normal et qu'on enregistre le diagramme.

Dans deux expériences seulement (sur quinze), un effet d'adsorption des plaquettes sur la compresse a été trouvé.

Conclusions

Ces essais montrent que la compresse hémostatique Surgicel a constamment un effet activateur de la coagulation mais ne provoque qu'inconstamment un appel de plaquettes.

III - BOTROPASE -

C'est le nom de marque d'une solution thérapeutique de venin de Botropas Jararaca, lequel est connu pour se comporter comme une thrombine.

Il nous a été demandé de vérifier ses propriétés coagulantes par thrombo-dynamographie.

Action sur le PRP (20 expériences)

Nous avons ajouté de la botropase en quantité croissante dans des PRP de façon à obtenir des dilutions du produit allant du 1/10 au 1/1000.

On obtient dans les 25 essais un important raccourcissement de r et k et une augmentation de l'amplitude maxima.

Nous retrouvons donc les modifications antérieurement décrites par de Nicola (20).

Action sur le PDP (20 essais)

On ne note aucune modification des diagrammes.

Incubation des plaquettes dans la botropase (25 essais)

Nous avons incubé les plaquettes pendant une demi-heure à 18 ou à 37° selon les techniques précédemment décrites.

Pour de fortes concentrations (1/10 à 1/100), non réalisables en thérapeutique, on a beaucoup de difficultés pour remettre les plaquettes en suspension. Elles ont tendance à rester agglomérées en petits amas ce qui provoque une diminution de l'amplitude maxima des diagrammes.

Avec des dilutions plus importantes on n'observe plus aucune modification des diagrammes.

Action sur la lyse du caillot des euglobulines (10 essais)

L'adjonction de botropase à une solution d'euglobulines ne provoque pas d'accélération de la lyse spontanée de leur caillot.

Les plaquettes incubées dans la botropase ne modifient pas non plus le temps de lyse obtenu avec des plaquettes incubées en tampon véronal-acétate.

Conclusions

Les essais réalisés confirment ceux de de Nicola : ils montrent l'action thrombominétique de la botropase mais ne permettent pas de conclure ou non à une éventuelle action thromboplastique.

A des concentrations irréalisables en thérapeutique la botropase altère les plaquettes. Aux concentrations thérapeutiques elle ne modifie pas leurs propriétés thrombodynamiques et antifibrinolytiques.

- - - -

1- ESTEVE A., ESTEVE J., LAPORTE J. & REGNE F.

Activité antihémorragique d'un nouveau dérivé de la cyclohexadienolone.
Therapic 1960, 15, 110 - 118

2- HURWITT E.S., HENDERSON J., LORD G.H., GITLITZ G.F. & LEBENDIGER A.

A new surgical absorbable hemostatic agent ; experimental and clinical evaluation.
Am J. Surg. 1960, 100, 439 - 446

3- LEBENDIGER A., GITLITZ G.F., HURWITT E.S., LORD G.H. & HENDERSON J.

Laboratory and clinical evaluation of a new adsorbable hemostatic material prepared from oxidized regenerated cellulose.
Surg. Forum 1960, 10, 440-443.

C O N C L U S I O N S

Nous avons rapporté dans cette thèse trois années de recherches thrombodynamiques effectuées au Laboratoire d'Hématologie de la Maternité de l'Hôpital Tenon puis de l'Hôpital Bichat.

1- Nous avons d'abord été amenés à préciser quelques notions classiques sur la thrombodynamographie :

a) Notre statistique portant sur 500 diagrammes normaux de plasmas riches en plaquettes conduit aux résultats suivants dans les conditions techniques de nos examens :

r	:	Moyenne	17,5 mm	Valeurs extrêmes	12 à 22 mm
k	:	Moyenne	8 mm	Valeurs extrêmes	4 à 9,5 mm
r + k	:	Moyenne	25,5 mm	Valeurs extrêmes	16 à 31,5 mm
Am	:	Moyenne	55,5 mm	Valeurs extrêmes	46 à 65 mm

b) Nous avons étudié les conditions d'obtention standard des PDP qui, dans notre Laboratoire, sont systématiquement enregistrés en même temps que les PRP pour les besoins de la clinique et ont servi, en outre, comme substrats à nos recherches sur les plaquettes, le fibrinogène et le sérum.

Pour obtenir un PDP, il est nécessaire de centrifuger le PRP pendant trente minutes à 4500 tours/minute, puis de lui faire subir trois congélations-décongélations successives. On a intérêt à centrifuger d'abord lentement puis plus vite pour éviter autant que possible d'altérer les plaquettes.

c) Nous avons également précisé les conditions de séparation des plaquettes en vue de leur étude thrombodynamographique.

Les plaquettes sont séparées à partir d'un sang prélevé sur EDTA puis remises en suspension dans un PDP citraté. Notre technique ne provoque pas d'altérations notables des plaquettes puisque nous avons pu vérifier statistiquement que les diagrammes des PDP replaquetés par les éléments figurés ainsi préparés ont la même amplitude maxima que ceux des PRP d'origine.

2- Nous avons poursuivi des recherches nouvelles sur la fonction thrombodynamique des plaquettes :

a) Les 65 expériences d'appauvrissement et d'enrichissement d'un plasma en ses plaquettes montrent que la courbe de variations de l'amplitude maxima en fonction du nombre des plaquettes est exponentielle. Le gradient de l'augmentation de l'amplitude maxima décroît avec le nombre des plaquettes mais ne s'annule jamais. Le courbe ne devient asymptotique que pour des valeurs égales ou supérieures à 1.000.000 de plaquettes/mm³.

b) Les plaquettes thrombodynamiques ne peuvent subir sans altération plus de trois lavages ou une incubation de plus de 30 minutes quelle que soit la température.

Mais, contrairement aux données jusqu'à présent classiques, les plaquettes se conservent aussi bien à 18° qu'à 4°, du moins dans les premières heures.

c) En vue de recherches sur les augmentations de l'amplitude maxima liées en clinique à un syndrome extra-protéique inflammatoire, nous avons recherché l'influence éventuelle de certaines protéines sur la fonction thrombodynamique des plaquettes.

Ni la sérum-albumine, ni les γ -globulines, ni l'haptoglobine, ni le complexe haptoglobine-hémoglobine ne la modifient. Ils ne modifient pas non plus la fonction thromboplastique des mêmes plaquettes.

Par contre, la céruloplasmine se comporte comme un activateur des plaquettes et provoque leur métamorphose visqueuse. Sur le PRP cet effet de la céruloplasmine se traduit par les divers aspects graphiques de l'hyper-rétractilité.

d) Le facteur XII activé (facteur contact) active aussi les plaquettes en provoquant leur métamorphose visqueuse. Le phénomène a lieu dans l'atmosphère plasmatique périplaquettaire. L'activation du facteur XII (facteur Hageman) dans les expériences de coagulation, consomme un certain nombre de plaquettes et entraîne donc un accroissement des propriétés thromboplastiques globales des plaquettes en épuisant notablement leurs propriétés thrombodynamiques et leur aptitude à la rétraction.

e) Nous confirmons que les plaquettes thrombodynamiques protègent le caillot de la lyse par la plasmine.

Nous l'avons vérifié par une technique originale d'enregistrement thrombodynamographique de la lyse des euglobulines en présence de calcium. Dans les

systèmes étudiés on introduit les plaquettes à concentration croissante. Elles inhibent la lyse des euglobulines proportionnellement à leur nombre et à leur aptitude à structurer le caillot.

Cette activité antifibrinolytique des plaquettes intactes diminue quand le facteur XII de leur atmosphère plasmatique a été préalablement activé. Elle disparaît quand les plaquettes ont perdu leur morphologie. Le facteur XII activé se comporte comme un activateur de la lyse du caillot des euglobulines.

3- Nous avons étudié ensuite le rôle du fibrinogène sur l'amplitude maxima du PDP.

a) Nous avons d'abord réglé une technique de préparation de plasma déplaqueté, défibrinogéné soit par la thrombine, soit par la bentonite.

b) Les 40 expériences d'appauvrissement et d'enrichissement d'un plasma en fibrinogène nous ont montré que la courbe de variations de l'amplitude maxima du PDP dans ces conditions est exponentielle et même pratiquement linéaire dans la zone des variations physiologiques.

La pente du diagramme d'enrichissement est fonction de la richesse en fibrinogène et de la pureté de la fraction étudiée, ce qui permet de tester la qualité d'une fraction à usage thérapeutique et de calculer la quantité efficace de cette fraction à utiliser pour les transfusions.

Au-delà d'une certaine concentration en fibrine, on note l'existence dans le sérum d'un effet inhibiteur de la coagulation pouvant aller jusqu'à supprimer pratiquement toute possibilité de coagulation enregistrable. Cet effet anticoagulant est transportable dans les plasmas normaux. Il s'agit d'un inhibiteur différent des six antithrombines classiques.

c) S'il y a concordance mathématique entre le taux du fibrinogène et la valeur de l'amplitude maxima lorsqu'on enrichit expérimentalement un PDP connu, il n'en va pas de même en clinique.

Notre statistique sur 500 sujets normaux et 300 sujets hyperfibrinémiques montre une concordance d'ensemble entre le taux du fibrinogène et l'amplitude maxima du PDP mais démontre l'impossibilité d'établir une relation ^{individuelle} simple entre les deux valeurs. Pour un même taux de fibrinogène, l'amplitude maxima peut varier du simple au double. On ne peut donc jamais déduire le taux du fibrinogène de la valeur individuelle de l'amplitude maxima et inversement.

L'augmentation en clinique de l'amplitude maxima dans tous les syndromes inflammatoires avec extra-protéïnémie et ce manque de concordance statistique prouvent l'existence d'au moins un autre facteur de variation, ce qui nous a amené à étudier l'action du sérum et de diverses protéines sériques.

4- Le sérum présente au moins deux activités antagonistes sur la structuration du caillot :

a) Le facteur de stabilisation de la fibrine, thermostable, non absorbable, non dialysable, est actif seulement en présence de calcium. Mais la diminution progressive de l'amplitude maxima obtenue quand on ajoute des quantités croissantes de sérum à du fibrinogène purifié et qu'on coagule le mélange par la thrombine en l'absence de calcium, prouve l'existence d'un inhibiteur sérique de la structuration du caillot.

b) L'augmentation d'amplitude maxima qui existe constamment au cours des syndromes inflammatoires cliniques indiquait de tester expérimentalement l'action de différentes protéines purifiées sur l'amplitude maxima du PRP, du PDP ou du fibrinogène purifié coagulé par la thrombine.

Une intervention de la sérum-albumine dans la structuration du caillot avait été décrite par Sokal : nous ne l'avons pas retrouvée dans nos essais. De même les γ -globulines, l'haptoglobine, le complexe haptoglobine-hémoglobine et l'orosomucoïde sont inactifs du moins aux concentrations qui peuvent être rencontrées in vivo. Par contre, la céruloplasmine a une certaine activité, en particulier dans les systèmes purifiés : elle augmente l'amplitude maxima du PDP et se comporte comme un activateur des plaquettes dans la structuration et la rétraction du caillot.

o v o

Au terme de toutes ces études nous avons apporté des précisions importantes sur les propriétés thrombodynamiques du caillot. Les facteurs qui les conditionnent sont très complexes. Les plaquettes thrombodynamiques structurent, rétractent le caillot et le protègent contre la lyse.

L'activation du facteur XII s'avère très importante par les effets qu'elle produit sur les plaquettes et sur le système de la fibrinolyse. Le fibrinogène intervient fondamentalement. Plusieurs facteurs sériques sont également en cause.

Parmi eux le facteur de stabilisation de la fibrine et la céruloplasmine ont une action positive. Au contraire, un inhibiteur sérique a une action négative. L'inventaire de ces facteurs sériques n'est peut-être pas terminée. En particulier, il conviendrait d'étudier l'éventuelle action de macroglobulines (notamment de l' α_2 -macroglobuline).

Vu :

Le Président
de la thèse,

G. MARCHAL

Vu :

Le Doyen
de la Faculté de Médecine,

L. BINET

Vu et Permis d'Imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

J. ROCHE

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - BIERSTEDT P.
Über die Beteiligung der Thrombozyten an der Fibrinolyse.
Proc. VI th. Congr. Europ Soc. Haemat. Copenhagen 1957
Karger édit. Bâle 483 p.
- 2 - BIGGS R., DOUGLAS A.S., MACFARLANE R.G.
The initial stages of blood coagulation
J. Physiol. 1953, 122, 538-542
- 3 - BISERTE G., HAVEZ R., LATURAZE J., HAYEM A.
Séparation chromatographique sur D.E.A.D. Cellulose de quelques Séromu-
coïdes (orosomucoïde, α 1 glycoprotéine 35 S, haptoglobine, séromucoïde M.
C.R. Soc. Biol., 1961, 154, 2067-2073.
- 4 - BLOMBACK B.
Studies on Fibrinogen : its purification and conversion into fibrin.
Acta Phys. Scand. 1958, 43, (Suppl. 148) 51 p.
- 5 - BOUNAMEAUX Y.
Dosage des facteurs de coagulation contenus dans l'atmosphère plasmatique
des plaquettes humaines.
Rev. Fr. Et. Clin. Biol. 1957, 2, 52-63.
- 6 - BOUNAMEAUX Y.
Recherche sur l'empaquettement des surfaces étrangères et sur la coagula-
tion sanguine.
Mém. Acad. Roy. Méd. Belge 2ème série, 1958, 3, 9 - 73.
- 7 - BOUNAMEAUX Y.
Recherche sur le mécanisme de la rétraction du caillot et de la métamorpho-
se visqueuse des plaquettes.
Expérimentia, 1956, 12, 355-359.
- 8 - BOUNAMEAUX Y.
Sur le mécanisme de la rétraction du caillot et de la métamorphose vis-
queuse des plaquettes.
Rev. d'Hématol. 1957, 12, 16 - 34.
- 9 - BOUNAMEAUX Y.
Action de la thrombine et de la reptilase sur la métamorphose visqueuse
des plaquettes de diverses espèces animales.
Rev. Fr. Et. Clin. Biol. 1959, 4, 54-55.
- 10 - BRAUNSTEINER H., PAKESCH F.
Thrombocytoasthenia and thrombocytopathia : old names and new diseases.
Blood 1956, 2, 965-976.
- 11 - BUDTZ OLSEN O.E.
Clot retraction.
Blackwell scientific Publications, edit., Oxford) 1951, 1 vol. 163 p.

- 12 - BUCKELL M.
The effect of citrate on euglobulin method of estimating fibrinolytic activity.
J. Clin. Path. 1958, 11, 403.
- 13 - CAEN J.
Plaquettes sanguines et fibrinolyse.
Path. Biol. 1951, 9, 1501-1504.
- 14 - CAEN J., HAAS F.
Interréaction des plaquettes et du plasma dans la phase initiale de la coagulation du sang.
Rev. Fr. Et. Clin. Biol. 1960, 5, 146 - 152.
- 15 - Colloque sur la Thrombodynamographie.
(Clin. Mal. Sang, Fac. Med. Paris, 20 mai 1958)
Le sang, 1960, 31, 65-81
- 16 - CONLEY C.L., HARTMAN R.C., LALLEY J.S.
Studies on the initiation of coagulation by surface contact.
J. Clin. Invest. 1949, 28, 775-779
- 17 - CONLEY C.L., HARTMAN R.C., MORSE W.I.
The clotting behaviour of human platelet-free plasma. Evidence of the existence of a plasma thromboplastin.
J. Clin. Invest. 1949, 28, 340-352.
- 18 - COPLEY A.L., BECHER B.
Human, cow and rabbit native fibrin powders as anticoagulants.
Nature, 1961, 192, 568.
- 19 - COPLEY A.L., GELOT B.
Experimental production of vascular purpura in guinea-pig by guinea-pigs antifibrin serum of rabbits.
Am. J. Physiol. 1956, 187, 593.
- 20 - COPLEY A.L., STEICHELER D., SPRADAN M., THORLEY R.S.
The anticoagulant action of fibrin surfaces on mammalian blood.
Nature, 1959, 183, 1683.
- 21 - COPLEY A.L., THORLEY R.S.
Fibrinization and coating with other materials of glass surface for haemorrhologic studies.
Lab. Practice.
- 22 - de NICOLA P.
Thromboelastography.
C.C. Thomas edit., Springfield) 1 volume 1957, 110 p.
- 23 - de NICOLA P.
Report of the sub-committee on new clotting factors in : Wright, Koller, Beck - Progress in coagulation. (Transactions of the Conference held under the auspices of the International Committee on blood clotting factors)
Wiesbaden Germany, September 3/6 1961.
Frederick Karl Schattauer edit. Stuttgart, p. 347-370.

- 24 - de NICOLA P., CAPPELLETTI G.A.
Basi fisiopatologiche delle applicazioni diagnostiche e terapeutiche.
In : I Processi de coagulazione e i veleni degli ofidi.
(Ravizza Edit. Pavia) 1 vol. 1959, p. 17 à 173
- 25 - DUCKERT F., JUNG E., SHMERLING D.H.
A hitherto undescribed congenital haemorrhagic diathesis probably due
to fibrin stabilizing factor deficiency.
Thromb. Diath. Haem. 1960, 5, 178-186.
- 26 - ELLICOT C.E., CONLEY C.L.
Retraction of clot from purified fibrinogen.
Bull. J. Hopk. Hosp. 1951, 88, 321-331.
- 27 - EDWARD A., RHEINGOLD J.J., GROSBY W.H.
The platelet as a sponge. A review.
Blood, 1961, 17, 767-775
- 28 - FEISSLY R., LUDIN M.
Microscopie par contraste de phase. 3ème Application à l'hématologie.
Revue d'Hématol. 1949, 4, 481-501.
- 29 - GAGLIARDI L.
L'influenza de alcuni particolari de tecnica sulle caratteristiche del
TEG. In : Studi di Thromboelastografia (Ediz. di Hematologica, Pavia)
1 vol. 1955, p. 23 - 24
- 30 - GORMSEN J.
Hageman factor deficiency.
Thromb. Diath. Haem., 1962, 7, 249 - 257
- 31 - GOUDEMAND M., BISERTE G., HAVEZ R.
Rôle inhibiteur de l'orosomucoïde sur la coagulation sanguine.
Hémostase, 1961, 1, 355-361.
- 32 - GROSS R., HOLEMANS R.
Differenzierung des Einflusses der Blutplättchen auf die Fibrinolyse.
Klin. Wschr. 1960, 38, 999-1000.
- 33 - HAANEN C., HOMMES F., BENRAAD H., MORSELT G.
A case of Hageman factor deficiency and a method to purify the factor.
Thromb. Diath. Haem. 1960, 5, 201 - 217.
- 34 - HARTERT H.
Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie einem neuem unterschich-
ungsverfahren.
Klin. Wschr. 1948, 26, 577 - 583.
- 35 - HARTERT H.
Der Thrombelastographie. Eine Methode zur Physikalischen. Analyse der
Blutgerinnung.
Z. Ges. Exp. Med., 1951, 117, 189 - 203.

- 36 - HARTERT H.
Klinische Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie.
1°- Physiologische und methodische Grundlagen der Thrombelastographie.
Dtsch. Arch. f. Klin. Med. 1952, 199, 384 - 292.
- 37 - HARTERT H.
Ein Retraction-Cofactor in Serum.
Klin. Wschr. 1954, 32, 139 - 145.
- 38 - HARTERT H., SCHAEDEER J.A.
The physical and biological constants of thrombelastography.
Biorrheology, 1962, 1, 31 - 39.
- 39 - HOLEMANS R., GROSS R.
Influence of blood platelets on fibrinolysis.
Thromb. Diath. Haem., 1961, 6, 196-214.
- 40 - IATRIDIS S.G., FERGUSON J.H.
Effect of surface and Hageman factor on the endogenous or spontaneous activation of the fibrinolytic system.
Thromb. Diath. Haem., 1961, 6, 411 - 423.
- 41 - JOHNSON S.A., SCHNEIDER C.L.
The existence of antifibrinolysin activity in platelets.
Science, 1953, 117, 229 - 230.
- 42 - JOHNSTON C.L., FERGUSON J.H., O'HAULON F.A.
Surface activation of plasma clotting, a function of Hageman factor.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1958, 99, 197 - 201.
- 43 - JÜRGENS J.
Surfaces mouillables et thrombocytes.
IIIème Symposium de la Fondazione Valentino Baldacci. Formentor Majorque
19-24 avril 1960.
In : Facteurs sanguins et vasculaires dans les thromboses et l'hémostase spontanée.
Omnia Medica Edit. Pise, résumé p. 237-238.
- 44 - JÜRGENS J.
The significance of the Hageman factor for the effect of wettable surface on thrombocytes.
Thromb. Diath. Haem., 1962, 7, 48-25.
- 45 - KOLLER F.
Der heutige Stand der Gerinnungsforschung.
Thromb. Diath. Haem., 1958, 2, 407 - 427.
- 46 - KOWALSKI E., KOPEC M., NIEWIAROVSKI S.
An evaluation of the euglobulin method for the determination of fibrinolysis.
J. Klin. Path. 1959, 12, 215 - 223.
- 47 - LAKI, LORAND L.
On solubility of fibrin clots.
Science, 1948, 108, 280-291.

- 48 - LEE C.Y., JOHNSON S.A., SEEGER W.H.
Clotting of blood with Russel's viper venom.
J. Mich. Med. Soc., 1955, 54, 801 - 804.
- 49 - LEROUX M.E.
La Thromboélastographie (thrombodynamographie).
Etudes théoriques, techniques, expérimentales et cliniques sur la Thrombo-
élastographie et sur quelques problèmes connexes liés à la biologie de la
coagulation sanguine.
Thèse Doct. Méd. Paris, 1957, 407 pages (Garcia Edit., Asnières).
- 50 - LEROUX M. E., PRUGNAUD R., FRIGOT P.
Dosage du fibrinogène plasmatique par une technique rapide à la thrombine.
Ann. Biol. Clin. 1952, 10, 142-152.
- 51 - LEROUX M.E., SAMAMA M., BEASLAY Y., PROST R.J.
La thrombodynamographie dans l'exploration fonctionnelle des plaquettes.
Médecine d'Egypte, 1961, 10, 317-330.
Transfusion, 1962, 105, 169-178.
- 52 - LEROUX M.E., SAMAMA M., BEASLAY Y., PROST R.J., MARCHAL G.
Données nouvelles sur le comportement thrombodynamique du caillot. In :
Proc. VIII^e Congrès Européen Soc. Hematol., Wien, 1961
Karger Edit., Bâle 1962.
- 53 - LEROUX M.E., SAMAMA M., JAMAIN B., MARCHAL G.
Application de la thrombodynamographie simultanée du PRP et du PDP au
problème des thromboses et de leur traitement par les anticoagulants.
Path. Biol. 1961, 9, 341-348.
- 54 - LOEWI A.G., DAHLBERG A., DUNATHAN K., KRIEL R., WOLFINGER H.L.
Fibrinase 2 - Some physical properties.
J. Biol. Chem., 236, 2634 - 2643.
- 55 - LOEWI A.G., DUNATHAN K., GARDNER B., GALLANT J.A.
Fibrinase 3 - Some enzymatic properties.
J. Biol. Chem., 1961, 236, 2644 - 2647
- 56 - LOEWI A.G., DUNATHAN K., KRIEL R.
Fibrinase 1°- Purification of substrate and enzyme.
J. Biol. Chem., 1961, 236, 2625 - 2633.
- 57 - LOEWI A.G., EDSALL S.T.
Studies on the formation of urea insoluble fibrin.
J. Biol. Chem., 1954, 211, 829 - 838.
- 58 - LOEWI A.G., GALLANT J.A., DUNATHAN K.
Fibrinase 4°- Effect on fibrin solubility.
J. Biol. Chem., 1961, 236, 2648 - 2655.
- 59 - LUSCHER E.F.
Glucose als cofaktor bei der Retraktion des Blutgerinnsels.
Experientia, 1956, 12, 294 - 297.

- 60 - LUSCHER E.F.
Viscous metamorphosis of blood platelets and clot retraction.
Vox Sang, 1956, 1, 133 - 154.
- 61 - MARCHAL G., LEROUX M.E., DUHAMEL G., CHENDEROVITCH J., GOGLIN G.
Deux cas de splénomégalie myéloïde avec thrombocytémie hémorragipare.
Action du Myleran. Intérêt de la thrombélastographie.
Le Sang, 1957, 26, 245 - 259.
- 62 - MARCHAL G., LEROUX M.E., DUHAMEL G., SAMAMA M.
Aspect thrombodynamographique de l'hyperplaquettose dans les leucémies myéloïdes et dans les thrombocytémies hémorragiques. Nouvelles recherches.
Le Sang, 1958, 29, 666-667.
- 63 - MARCHAL G., LEROUX M.E., SAMAMA M.
Les anomalies thrombodynamographiques dans les leucémies myéloïdes.
Le Sang, 1958, 29, 265 - 273.
- 64 - MARCHAL G., LEROUX M.E., SAMAMA M.
La thrombodynamographie : sa place actuelle en clinique.
Presse Médicale, 1960, 51, 1919 - 1922
- 65 - MARCHAL G., LEROUX M.E., SAMAMA M.
Atlas de thrombodynamographie
(S.P.E.I. édit. Paris), 1962, 1 vol., 186 p.
- 66 - MARCHAL G., SAMAMA M., LEROUX M.E., PROST R.J.
Tests directs d'exploration de la fonction thrombodynamique des plaquettes.
Rev. Fr. Et. Clin. Biol., 1961, 6, 68 - 71
- 67 - MARGOLIS J.
Glass surface and blood coagulation.
Nature, 1956, 178, 805 - 806
- 68 - MARGOLIS J.
Experiments on Hageman factor. In : progress in coagulation (Transactions of the Conference held under the auspices of the International Committee on Blood clotting factors), Wiesbaden, Germany, Sept. 3 - 6 1961.
- 69 - MARX R.
Zur Kenntnis der für die Thrombusfestigkeit bedeutsame Blutfactoren.
Ergebnisse der Bluttransfusionsforschung.
Bibliotheca Haemat., 1957, 6, 147 - 153.
- 70 - MAUPIN B.
Recherches histochimiques et biochimiques sur les plaquettes sanguines de l'homme.
Thèse Doct. Sciences, Paris, 1953, 71 p.

- 71 - MAUPIN B.
Les plaquettes sanguines de l'homme.
Masson & C^o édit. Paris, 1954, 1 vol. 267 p.
- 72 - MAUPIN B.
Chimie des plaquettes sanguines. 1^o Chimie analytique.
Hémostase, 1961, 1, 29 - 54
- 73 - MILSTONE J. H.
A factor in normal human blood which participates in streptococcal fibrinolysis.
J. Immunol., 1941, 42, 109 - 115
- 74 - MOUQUIN M., MARCHAL G., SAUVAN R., SAMAMA M., LEROUX M.E., RICHON J.
Intérêt et limites de la thrombélastographie dans la surveillance des traitements anticoagulants en cardiologie.
Presse Médicale, 1958, 66, 1703-1705.
- 75 - NIEWIAROVSKI S., PROU-WARTELLE O.
Rôle du facteur contact (f.Hageman) dans la fibrinolyse.
Thromb.Diath.Haem. 1959, 5, 593.
- 76 - NILSSON I.M., BLOMBACK M., FRANCKEN I.
On an inherited autosomal haemorrhagic diathesis with A.H.G. deficiency and prolonged bleeding time.
Acta Med.Scand. 1957, 159, 35-41
- 77 - NILSSON I.M., YAMASHINA I.
Effect of human α 1 acid glycoprotein on the blood coagulation.
Nature, 1958, 181, 711-712.
- 78 - O'BRIEN J.R.
The platelet like activity of serum.
Brit.J. Haem, 1955, 1, 223-228.
- 79 - OLLENDORFF P.
Platelet activity and activation of blood clotting by glass.
Thromb.Diath.Haem. 1960, 4, 410-423.
- 80 - OLLENDORFF P.
Glass effect and platelet activity in Hageman plasma.
Thromb.Diath.Haem. 1961, 6, 104-112.
- 81 - PROST R.J.
L'amplitude maxima du thrombodynamogramme. Influence des plaquettes et du fibrinogène. Application à l'étude des anticorps antiplaquettaires.
Thèse Doct.Med., Lyon, 1959, 90 p.
- 82 - QUICK A.J.
Coagulation du sang et hémostase. Editorial.
Hémostase, 1961, 1, 105-107.
- 83 - RATNOFF O.D.
Mecanism of blood coagulation.
In : Connective tissue, Thrombosis and Atherosclerosis
Academie Press edit. New-York, 1 vol., 1959, p.213-222.

- 84 - RATNOFF O.D.
Hageman trait.
In : New blood clotting factors (Transactions of the Conference Held under the auspices of the International Committee on blood clotting factors. Montreux, Switzerland, August 24-26 1959.
Thromb.Diath.Haem. Suppl. ad. Vol IV, p.116-122.
- 85 - RATNOFF O.D., ROSENBLUM J.M.
The role of Hageman factor in the initiation of clotting by glass.
J.Lab.Clin.Med. 1957, 50, 941-942.
- 86 - REID W.O., SOMLYO A.V., SOMLYO P., CUSTER R.P.,
Role of the platelets in fibrinolysis.
Am.J.Clin.Path.1962, 37, 561-566.
- 87 - SALMON J.
Recherches immunologiques sur l'existence d'une atmosphère plasmatique entourant les plaquettes humaines.
in : Proc.VII th. international Congress soc. Hematol., Roma 1958 (il pensiero scientifico edit. Roma 1958).
- 88 - SALMON J.
Adsorption des protéines par les plaquettes sanguines.
Expériencia 1960, 26, 26-28.
- 89 - SCHAFFRIR E., DE VRIES A.
Studies on the clot promoting activity of glass.
J.Clin.Invest 1956, 35, 1183-1190.
- 90 - SCHNEIDER W., RODERMUND O.E., EGLI H.
Das normale thromboelastogramm.
Thromb.Diath.Haem. 1962, 7, 35-47.
- 91 - SCHARP A.A.
Viscous metamorphosis of blood platelets. A study of the relation-ship to coagulation factors and fibrin formation.
Brit.J.Hematol.1958, 4, 28-35.
- 92 - SCHULMAN S.
The fibrin serum factor.
Nature, 1953, 171, 606-612.
- 93 - SMITH H., EDMAN P., OWEN J.A.
N. Terminal Amino Acids of human haptoglobins
Nature, 1962, 193, 286-287.
- 94 - SOKAL G.
Applications expérimentales de la thrombélastographie.
Rev.Belge Path. 1957, 26, 220-232.
- 95 - SOKAL G.
Plaquettes sanguines et structure du caillot. Etude morphologique et thrombélastographique.
Aescia, Bruxelles, edit., 1960, 1 vol. 234 p.

- 96 - SOULIER J.P.
La bentonite nouvel adsorbant des facteurs de coagulation.
Rev.Hématol. 1959, 14, 26-29.
- 97 - SOULIER J.P., WARTELLE O., MENACHE D.
Hageman trait and PTA deficiency, the role of contact of blood with glass.
Brit. J. Haematol.1959, 5, 121-138.
- 98 - STEFANINI M., MURPHY I.S.
Studies on platelets. 14° human platelets as source of antifibrinolysis.
J.Clin Invest 1956, 1, 355-361.
- 99 - STEINBUCH M.
La céruлоplasmine.
Rev.d'Hématol. 1958, 13, 387-401
- 100 - STEINBUCH M.
Les techniques d'isolement de l'haptoglobine.
N.R.F. Hématol. 1962, 2, 448-454.
- 101 - TRIANTAPHYLLOPOULOS D.C.
Anticoagulant effect of incubated fibrinogen.
Canad. J. Biochem. Physiol. 1958, 36, 250-259.
- 102 - TRIANTAPHYLLOPOULOS D.C.
Nature of the thrombin inhibiting effect of incubated fibrinogen.
Am. J. Physiol. 1959, 197, 575-579.
- 103 - TRIANTAPHYLLOPOULOS D.C.
A.F.I.F. inhibitor from fibrinogen.
In : Progress in coagulation (Transactions of the Conference held under the auspices of the International Committee on blood clotting factors. Wiesbaden, Germany, September 3-6 1961.
Thromb.Diath.Haem. 1962, Suppl. 1, ad. vol. VII.
- 104 - TRIANTAPHYLLOPOULOS D.C.
Anticoagulant action of T.A.M.c and A.F.I.F.
Am.J.Physiol.1961, 200, 771-774.
- 105 - TRIANTAPHYLLOBOULOS D.C., QUICK A.J., GREENWALT T.J.
Action of disodium ethylene-diamine tetracetate on blood coagulation.
Evidence of the development of heparinoïd activity during incubation or aeration of plasma.
Blood 1955, 10, 534-544.
- 106 - TRIANTAPHYLLOPOULOS E., TRIANTAPHYLLOPOULOS D.C.
Coagulation studies on the electrophoretic fractions of A.F.I.F.
Am.J.Physiol.1962, 203, 595-599.
- 107 - VON KAULLA K.N., SCHULTZ R.L.
Methods for the evaluation of human fibrinolysis.
Am.J.Clin.Path.1958, 29, 103-112
- 108 - VREEKEN J.
Thrombélastographie.
Thèse Doct.Med. Amsterdam 1957.

109 - WAALER B.A.

Contact activation in the intrinsic blood clotting system.
Scand. J. Clin.Lab.Invest 1959, 11, Suppl. 37.

110 - WEINER M., WEINBERG L.G.

Clot firmness.
Blood, 1957, 12, 1125-1131.

111 - ZUCKER M.B.

Some effects of the disodium ethylene-diamine-tetracetate on blood coagulation.
Am.J.Clin.Path. 1954, 24, 39-41

112 - ZUCKER M.B., BORELLI J.

Reversible alteration in platelets morphology produced by anticoagulants and by cold.
Blood, 1954, 9, 602-608.

113 - ZUCKER M.B., BORELLI J.

Viscous metamorphosis produced by chilling and by clotting.
Failure to find specific deficit of viscous metamorphosis in P.T.A. syndrom.
Thromb.Diath.Haem. 1960, 4, 424-434.

TABLE DES MATIERES

	Pages
- INTRODUCTION	1
- Chapitre I - HISTORIQUE	2
- Chapitre II - TECHNIQUES D'ETUDES	6
- Chapitre III - RECHERCHES SUR LES CONDITIONS DE PREPARATION D'UN PLASMA DEPLAQUETTE	14
- Chapitre IV - PREPARATION DE SUSPENSIONS PLAQUETTAIRES UTILISABLES EN THROMBODYNAMOGRAPHIE EXPERIMENTALE	21
- Chapitre V - EFFET DU NOMBRE DES PLAQUETTES THROMBODYNA- MIQUES SUR L'AMPLITUDE MAXIMA DES DIAGRAMMES DE P. R. P.	25
- Chapitre VI - DEVENIR DE LA FONCTION THROMBODYNAMIQUE DES PLAQUETTES APRES LAVAGE ET INCUBATION	30
- Chapitre VII - ETUDE DE L'EFFET DE L'ACTIVATION DU FACTEUR XII (f.Hageman) SUR L'ACTIVITE THROMBO- DYNAMIQUE DES PLAQUETTES	36
- Chapitre VIII - ACTION DES PLAQUETTES SUR LA LYSE DU CAILLOT DES EUGLOBULINES	42
- Chapitre IX - ETUDE DE L'INFLUENCE DU FIBRINOGENE SUR L'AMPLITUDE MAXIMA DU PDP	51
- Chapitre X - DEMONSTRATION PAR LA STATISTIQUE CLINIQUE DE L'EXISTENCE D'AUTRES FACTEURS QUE LE FIBRINOGENE DANS LES VARIATIONS DE L'AMPLI- TUDE MAXIMA DU PDP	58
- Chapitre XI - ACTION DU SERUM SUR L'AMPLITUDE MAXIMA DU PDP	84
- Chapitre XII - ETUDE DE L'ACTION DE QUELQUES PROTEINES SERIQUES SUR L'AMPLITUDE MAXIMA DU PRP et DU PDP	88
- Chapitre XIII - EXEMPLES D'APPLICATION DES RECHERCHES PRE- CEDENTES EN PHARMACODYNAMIE :	
Recherches sur l'action éventuelle de trois agents thérapeutiques sur les plaquettes . .	91
- CONCLUSIONS	95
- BIBLIOGRAPHIE	

